

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS INSTITUTO
DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DEPARTAMENTO DE
GENÉTICA, ECOLOGIA E EVOLUÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



Dissertação de Mestrado

**MODULAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO EIXO INTESTINO-CÉREBRO PELO
CONSUMO DE CEPAS PROBIÓTICAS**

Orientado: Emiliano Rosa Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Co-orientador: Dr. Fillipe Luiz Rosa do Carmo

Belo Horizonte

2020

Emiliano Rosa Oliveira

**MODULAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO EIXO INTESTINO-CÉREBRO PELO
CONSUMO DE CEPAS PROBIÓTICAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais. Como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Coorientador: Dr. Fillipe Luiz Rosa do Carmo

Belo Horizonte

2020

043

Oliveira, Emiliano Rosa.

Modulação de genes envolvidos no eixo intestino-cérebro pelo consumo de cepas probióticas [manuscrito] / Emiliano Rosa Oliveira. – 2020.

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

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo. Coorientador: Dr. Fillipe Luiz Rosa do Carmo.

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

1. Genética. 2. Probióticos. 3. Microbioma Gastrointestinal. 4. Cérebro. 5. Ácido gama-Aminobutírico. 6. *Lactobacillus delbrueckii*. 7. *Lactococcus lactis*. I. Azevedo, Vasco Ariston de Carvalho. II. Carmo, Fillipe Luiz Rosa do. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 575



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

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO	304/2020 entrada
Emiliano Rosa Oliveira	2º/2018 CPF: 113.485.076-08

Às nove horas do dia **18 de dezembro de 2020**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Modulação de genes envolvidos no eixo intestino-cérebro pelo consumo de cepas probióticas**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo	UFMG	283.171.225-49	APROVADO
Dr. Fillipe Luiz Rosa do Carmo	UFMG	053.826.576-02	APROVADO
Dr. Álvaro Cantini Nunes	UFMG	678.159.606-34	APROVADO
Dra. Cristina Stewart Bittencourt Bogsan	USP	153.275.258-05	APROVADO

Pelas indicações, o candidato foi considerado: **APROVADO**

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato 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.

Belo Horizonte, 18 de dezembro de 2020.

Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo - Orientador (UFMG)

Dr. Fillipe Luiz Rosa do Carmo - Coorientador (UFMG)

Dr. Álvaro Cantini Nunes - (UFMG)

Dra. Cristina Stewart Bittencourt Bogsan - (USP)

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Fillipe Luiz Rosa do Carmo, Usuário Externo**, em 18/12/2020, às 11:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristina Stewart Bogsan, Usuário Externo**, em 18/12/2020, às 11:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alvaro Cantini Nunes, Membro**, em 18/12/2020, às 11:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, Professor do Magistério Superior**, em 18/12/2020, às 14:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



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, informando o código verificador **0484221** e o código CRC **835CBE21**.



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Modulação de genes envolvidos no eixo intestino-cérebro pelo consumo de cepas probióticas"

Emiliano Rosa Oliveira

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo - Orientador
UFMG

Fillipe Luiz Rosa do Carmo - Coorientador
UFMG

Álvaro Cantini Nunes
UFMG

Cristina Stewart Bittencourt Bogsan
USP

Belo Horizonte, 18 de dezembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Fillipe Luiz Rosa do Carmo, Usuário Externo**, em 18/12/2020, às 11:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristina Stewart Bogsan, Usuário Externo**, em 18/12/2020, às 11:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alvaro Cantini Nunes, Membro**, em 18/12/2020, às 11:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, Professor do Magistério Superior**, em 18/12/2020, às 14:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site



[https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[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 **0484261** e o código CRC **AF4B7738**.

Referência: Processo nº 23072.247773/2020-61

SEI nº 0484261

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço os meus mestres, muitos são os que me direcionaram ao caminho que estou seguindo, mas a Professora Andreia Ribeiro e o Professor Gustavo pessoa foram aqueles que fizeram meus olhos brilharem para as Ciências Biológicas durante a minha formação no ensino médio.

Aos meus pais pelo apoio incondicional e por serem o maior exemplo da minha vida, são meu modelo de caráter, humanidade e compaixão.

Aos meus irmãos por acreditarem no meu potencial e me instigarem a ser um profissional melhor.

Ao Theo e Gael por serem pessoinhas iluminadas que alegram meu dia a qualquer momento.

Ao Giovany por todo o amor e carinho que me deu durante toda a minha formação, por ser um dos meus alicerces junto aos meus pais.

A cada um dos professores que me apoiaram durante minha graduação em especial Leticia e Geraldo que foram responsáveis pela conclusão da minha graduação, Renata, Nelson, Cyntia, Juliana e Breno por ensinamentos incríveis que me deram em cada momento dentro da faculdade.

Ao professor Dr. Vasco Azevedo por acreditar em mim e oferecer a melhor estrutura científica possível, pela paciência e por cada ensinamento proporcionado em toda a minha permanência no LGCM.

Ao Fillipe por todo o apoio e compreensão, por acreditar na minha capacidade até mesmo quando eu mesmo não acreditava, também por me ajudar a ser uma pessoa melhor.

A Bárbara por ter sido a melhor mestranda que eu poderia ter na minha iniciação científica e a melhor doutoranda durante meu mestrado, além de me apoiar em cada um dos momentos difíceis que tivemos durante este período, e também por ajudar tanto na minha orientação.

A Giovana, Sarinha e Bruna por terem sido grandes companheiras durante este período e por cada ajuda que me deram para a finalização do meu trabalho.

Ao Gabriel, Sara Giovana, Maria Izabel, Marina, Deivison e Caio por terem sido grandes alunos e por terem ajudado em cada um dos trabalhos que fizemos juntos.

A todos os demais membros e amigos do LGCM pelos excelentes momentos vividos.

A cada um dos meus amigos pelo companheirismo, pelo amor e momentos de descontração nas horas mais difíceis, em especial Amanda, Dênis e Mateus que ouvem todos os meus problemas o tempo todo.

A cada um dos colaboradores deste trabalho aos quais contribuíram para que alcançássemos o resultado final.

RESUMO

Atualmente sabe-se que a microbiota intestinal modula funções imunológicas e hormonais no organismo. Além disso, influencia o funcionamento do sistema nervoso, isso graças à comunicação bidirecional que ocorre no eixo intestino-cérebro. Bactérias específicas da microbiota intestinal possuem a capacidade de produzir neurotransmissores, como o ácido gama-aminobutírico (GABA) o qual é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, produzido a partir da descarboxilação do glutamato. Como ferramenta alternativa para estudos no contexto de doenças psicopatológicas há uma crescente utilização de microrganismos probióticos em estudos relacionados ao eixo intestino-cérebro. Algumas linhagens probióticas como *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ327 e *Lactococcus lactis* NCDO2118 possuem a capacidade de sintetizar neurotransmissores importantes como o GABA, o que se torna uma importante ferramenta no desenvolvimento de terapias alternativas para o combate a psicopatologias. Nosso trabalho demonstrou que a administração a longo prazo de cepas probióticas produtoras de GABA aumentou a expressão relativa de genes relacionados a integridade da barreira epitelial, como *Tjp1*, *Tjp2*, *Ocln* e *Muc2*. O mesmo é visto quando avaliamos os genes de citocinas ligadas a ativação da comunicação do eixo *Il-6* e *Il-1 β* no tecido do cólon, e os indicadores da resposta neurológica avaliados em ambos os tecidos cólon e hipocampo, como *Grin2a*, *Grin2b*, *Tdo2*, *Ido1*, *GABAA1* e *GABAA2*. Desta forma a administração de cepas probióticas em longo prazo é capaz de modular a expressão gênica dos marcadores avaliados neste trabalho no eixo intestino-cérebro.

Palavras chave: Probióticos; psicobióticos; síntese de GABA, *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ327, *Lactococcus lactis* NCDO2118.

ABSTRACT

It is now known that the intestinal microbiota modulates immune and hormonal functions in the body. Also, it influences the functioning of the nervous system, due to the bidirectional communication that occurs in the gut-brain axis. Specific bacteria in the intestinal microbiota have the ability to produce neurotransmitters, such as gamma-aminobutyric acid (GABA) which is the main inhibitory neurotransmitter in the central nervous system, produced from the decarboxylation of glutamate. As an alternative tool for studies in the context of psychopathological diseases, there is an increasing use of probiotic microorganisms in studies related to the gut-brain axis. Some probiotic strains such as *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ327 and *Lactococcus lactis* NCDO2118 have the ability to synthesize important neurotransmitters such as GABA, which becomes an important tool in the development of alternative therapies to combat psychopathologies. Our work demonstrated that the long-term administration of probiotic GABA-producing strains increased the relative expression of genes related to the integrity of the epithelial barrier, such as *Tjp1*, *Tjp2*, *Ocln* and *Muc2*. The same is seen when we evaluate the cytokine genes linked to the activation of the communication of the Il-6 and Il-1 β axis in the colon tissue, and the neurological response indicators evaluated in both the colon and hippocampus tissues, such as *Grin2a*, *Grin2b*, *Tdo2*, *Ido1*, *GABAA1* and *GABAA2*. Thus, long-term administration of probiotic strains is able to modulate the gene expression of the markers evaluated in this work on the gut-brain axis.

Keywords: Probiotics; psychobiotics; GABA synthesis, *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ327, *Lactococcus lactis* NCDO2118.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Delineamento Experimental.....	33
Figura 2: Gráfico de variação de peso, CNRZ327.....	40
Figura 3: Gráfico de variação de peso, NCDO2118.	40
Figura 4: Expressão relativa do mRNA dos genes envolvidos na integridade da berreira epitelial, CNRZ327	41
Figura 5: Expressão relativa do mRNA dos genes envolvidos na integridade da berreira epitelial, NCDO2118	43
Figura 6: Expressão relativa do mRNA dos genes de citocinas relacionadas diretamente à resposta inflamatória, CNRZ327	44
Figura 7: Expressão relativa do mRNA dos genes de citocinas relacionadas diretamente à resposta inflamatória, NCDO2118	45
Figura 8: Expressão relativa do mRNA dos genes relacionados a resposta neurológica no cólon, CNRZ327.	46
Figura 9: Expressão relativa do mRNA dos genes relacionados a resposta neurológica no cólon, NCDO2118	48
Figura 10: Expressão relativa do mRNA dos genes relacionados a resposta neurológica no hipocampo, CNRZ327	49
Figura 11: Expressão relativa do mRNA dos genes relacionados a resposta neurológica no hipocampo, NCDO2118	51
Figura 12: Fluxograma da modulação das cepas probióticas a longo prazo	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação dos grupos experimentais	32
Tabela 2: Primers e condição de amplificação genes Housekeeping	35
Tabela 3: Primers e condição de amplificação das amostras do Hipocampo.	36
Tabela 4: Primers e condição de amplificação das amostras do Cólon	36
Tabela 5: Concentração de GABA e Glutamato em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	39

LISTA DE ABREVIACÕES

μL – Microlitro

BL – Bactéria Láctica

CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

CLD1 – Claudin 1

CNRZ327 – *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ327

DNA – Ácido desoxirribonucleico

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FDA - Food and Drug Administration

GABAA1 - GABA receptor A α 1

GABAA2 – GABA receptor A α 2

GAPDH - Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GEE – Departamento de Genética Ecologia e Evolução

GRIN2A - Glutamate receptor, ionotropic, NMDA2A (epsilon 1)

GRIN2B - Glutamate receptor, ionotropic, NMDA2B (epsilon 2)

HCL – Ácido Clorídrico

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IDO1 - Indoleamine 2,3-dioxygenase 1

IgA – Imunoglobulina A

IL-10 – Interleucina 10

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina 6

L - Litro

LGCM – Laboratório de Genética Celular e Molecular

M - Molar

Mg - Miligrama

mL - Mililitro

mRNA – RNA Mensageiro

MRS – Man Rogosa e Sharpe

NCDO2118 – *Lactococcus lactis* NCDO2118

NL₂ – Nitrogênio Líquido

NM – Nanomolar

NMDAR – *N*-Metil-d-aspartato

OCLN - Ocludina

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial Hidrogeniônico

RNA – Acido Ribonucleico

RT-qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

TDO2 - Tryptophan 2,3-dioxygenase

TGI – Trato Gastrointestinal

TH - Tyrosine hydroxylase

TJP1 – Tight Junction Protein 1

TJP2 – Tight Junction Protein 2

TPH - Tryptophan hydroxylase 1

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

WHO/OMS – Organização Mundial da Saúde

YEL - Yeast Extract sodium Lactate

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Barreira epitelial e resposta imune da mucosa intestinal	17
1.2. Microbiota	18
1.3. Comunicação entre o Trato Gastrointestinal e o Sistema Nervoso Central	19
1.3.1. GABA principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso.	21
1.4. Probióticos	22
1.4.1 História da Arte	22
1.4.2. Mecanismos de ação dos Probióticos	23
1.4.2.1. Produção de substâncias antimicrobianas	23
1.4.2.2. Modulação do sistema imune	24
1.4.2.3. Exclusão competitiva	24
1.4.3. Microrganismos Probióticos na Modulação do eixo Intestino-Cérebro	25
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVO	28
3.1. Objetivo Geral	28
3.2. Objetivos Específicos	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. Triagem de linhagens probióticas para a produção de ácido gama-aminobutírico (GABA)	29
4.1.1. Linhagens Bacterianas	29
4.1.1.1. Condições de cultivo	29
4.1.2. Extração de GABA e Glutamato	--
4.1.2.1. Dosagem de GABA e Glutamato por Cromatografia Líquida de Alta Performance (High performance liquid chromatography – HPLC)	30
4.2. Animais	31
4.2.1. Delineamento Experimental	31
4.3. Parâmetros avaliados	33
4.3.1 Evolução do peso dos animais	33
4.3.2. PCR em Tempo Real	33
4.3.2.1. Extração e Tratamento de RNA Total do Hipocampo	33
4.3.2.2. Extração e Tratamento de RNA Total do Cólon	33

4.3.2.3	Análise da Expressão Relativa por PCR em Tempo Real	34
4.4.	Análises Estatísticas	37
5.	RESULTADOS	38
5.1.	Dosagem de GABA	38
5.2.	Avaliação da Variação de Peso	39
5.3.	Expressão Relativa do mRNA por RT-qPCR	41
5.3.1.	Expressão Relativa do mRNA da Mucosa do Cólon	41
5.3.1.1	Barreira Epitelial	41
5.3.1.1.1.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> CNRZ327	41
5.3.1.1.2.	<i>Lactococcus lactis</i> NCDO2118	42
5.3.1.2	Genes relacionados a resposta inflamatória	44
5.3.1.2.1.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> CNRZ327	44
5.3.1.2.2.	<i>Lactococcus lactis</i> NCDO2118	44
5.3.1.3	Indicadores de Resposta Neurológica	46
5.3.1.3.1.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> CNRZ327	46
5.3.1.3.2.	<i>Lactococcus lactis</i> NCDO2118	47
5.3.2.	Expressão Relativa do mRNA no Hipocampo	48
5.3.1.3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> CNRZ327	48
5.3.1.3	<i>Lactococcus lactis</i> NCDO2118	50
6.	DISCUSSÃO	51
7.	CONCLUSÃO	59
8.	PERSPECTIVAS	60
9.	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	61
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

1.1. Barreira epitelial e resposta imune da mucosa intestinal

O trato gastrointestinal (TGI) é um complexo sistema responsável pela manutenção do organismo (GELBERG, 2014). O TGI é constituído por vários órgãos, cada um responsável por funções específicas. A boca atua na trituração do alimento, a língua auxilia na trituração e deglutição do bolo alimentar, o esôfago permite a passagem do bolo alimentar, o estômago digere este bolo alimentar, o intestino delgado é responsável pela absorção de nutrientes e, por fim, o intestino grosso faz a eliminação dos resíduos alimentares (RODRIGUES *et al.*, 2014).

O intestino é subdividido em intestino delgado, este compreende a porção do TGI localizado entre o estômago e o ceco, possui estruturas que se projetam para o lúmen, chamadas de vilosidades, o que permite a extensão da estrutura intestinal como um todo aumentando a capacidade de absorção de nutrientes pelo órgão, e o intestino grosso, este apresenta uma superfície relativamente plana o que facilita a passagem do quilo até a eliminação posterior. O epitélio não é exatamente uma camada reta de células, ele possui uma série de invaginações denominadas criptas de *Lieberkühn* (FESSLER, MICHAEL B.; RUDEL, LAWRENCE L.; BROWN, 2008). Morfologicamente são formadas por um tubo oco, composto de um lúmen com diâmetros variáveis e revestidos por quatro diferentes camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (GELBERG, 2014). A mucosa intestinal é caracterizada por sua capacidade de absorver os nutrientes advindos da alimentação e também por ser a primeira barreira física ao qual impede a entrada de elementos externos para interior da cavidade intestinal (XIAO *et al.*, 2018).

Diversos tipos celulares são encontrados no epitélio intestinal cada uma desempenhando uma função específica. Os enterócitos são as células mais abundantes do tecido, são responsáveis principalmente pela absorção de nutrientes e água, além de participarem da resposta imune da mucosa intestinal (CROSNIER; STAMATAKI; LEWIS, 2006). Uma das maneiras que ocorre esta modulação é por meio da liberação de imunoglobulina A (IgA) no lúmen, este anticorpo é de grande importância na manutenção da homeostase e proteção do epitélio auxiliando no combate a microrganismos patogênicos invasores (NAVARRO *et al.*, 2016).

Além dos enterócitos há a presença das células caliciformes responsáveis pela produção e liberação muco. Este muco é rico em mucina que é uma glicoproteína de alto peso molecular, importante para a manutenção da barreira epitelial. Este muco recobre toda a extensão do tecido formando uma camada que impede a adesão direta de microrganismos na parede intestinal, além lubrificar o órgão (CROSNIER; STAMATAKI; LEWIS, 2006).

Outro importante grupo de células que faz parte da composição do tecido são as células de Paneth, esta por sua vez secreta fatores antimicrobianos, as defensinas as quais são capazes de combater possíveis infecções por microrganismos patológicos (JOHANSSON; HANSSON, 2016).

A composição da mucosa possibilita a liberação de uma série de substâncias e elementos sinalizadores capazes de iniciar uma potente resposta imunológica efetiva para o combate de microrganismos patológicos impedindo sua colonização, o que mantém a integridade do epitélio (ALLAIRE *et al.*, 2018).

O estudo dos genes referentes aos componentes da barreira epitelial nos permite avaliar sua expressão e deduzir assim a sua integridade. As proteínas *Tight junctions Tjp1* e *Tjp2* são responsáveis pela adaptação de zonas de oclusão e junções aderentes, e componentes para a montagem adequada das zonas respectivamente (LA FATA; WEBER; MOHAJERI, 2018; ZAKOSTELSKA *et al.*, 2011). Claudina-1 também representa importante função na composição das zonas de oclusão, esta é uma proteína integral da membrana e um componente das cadeias de junção (ZHANG *et al.*, 2018). A ocludina, proteína de membrana integral que é necessária para a regulação induzida por citocinas de barreira de permeabilidade paracelular de zonas de oclusão (ZAKOSTELSKA *et al.*, 2011), e por fim *Muc2*, proteína é secretada e forma uma barreira mucosa insolúvel que protege o lúmen intestinal (MARTÍN *et al.*, 2017).

1.2. Microbiota

Além da constituição tecidual, temos tanto no intestino delgado quanto intestino grosso, uma grande diversidade biológica onde diversos microrganismos colonizam toda a sua extensão (SEKIROV; RUSSELL; ANTUNES, 2010). Estes microrganismos, em conjunto são chamados de microbiota intestinal. Esta microbiota possui uma grande variedade de microrganismos, e são de extrema importância para a manutenção da homeostase do seu

hospedeiro. A microbiota é composta em sua maior parte, por bactérias, sendo aproximadamente 2100 espécies de microrganismos, pertencentes principalmente aos filos Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobactéria e Proteobactéria (THURSBY; JUGE, 2017). Estas bactérias podem ser residentes, já que colonizam permanentemente o tecido, ou podem ser transitórias pois não persistem por longos períodos no hospedeiro. As bactérias transitórias são comumente introduzidas por meio da ingestão de alimentos tais como iogurte, leite fermentado ou outro produto que contenha linhagens bacterianas vivas, contudo elas precisam ser consumidas de forma contínua (NEISH, 2006).

A microbiota possui uma grande importância para o hospedeiro, sendo capaz de regular a colonização do TGI e impedir que microrganismos patológicos se instalem na mucosa. Isto se deve ao processo de exclusão competitiva que ocorre pelo espaço, nutrientes e receptores de adesão. Além disso há a produção de diversos metabólitos inibidores de crescimento que modulam a produção de toxinas dos microrganismos patológicos.(GARRETT, 2017; NEISH, 2006). Esta microbiota também é responsável pelo desenvolvimento e maturação do sistema imune do hospedeiro (NEUTRA *et al.*, 1999). Exemplos desta interação são o desenvolvimento dos tecidos linfoides e a ativação das células T na mucosa intestinal, há uma intrínseca relação entre a liberação de metabólitos como os ácidos graxos de cadeia curta e a regulação das vias de ativação de células T. (HOOPER; MACPHERSON, 2010).

Importantes cepas constituinte da microbiota como *Bacteroides fragilis*, e bactérias pertencentes às Firmicutes são capazes de induzir a diferenciação de linfócitos e contribuir para que seja desenvolvida a tolerância de microrganismos intestinais a partir da produção de citocinas (ATARASHI *et al.*, 2011).

Ao avaliar a participação da microbiota no desenvolvimento e maturação do sistema imune, torna-se possível investigar como ocorre a modulação e a comunicação entre o TGI e o SNC. Estudos apontam que o sistema imunológico é um caminho de comunicação chave entre estes sistemas. Diversos componentes do sistema imune, por exemplo citocinas pró-inflamatórias são capazes de regular e ativar neurotransmissores e células no epitélio intestinal, que instigam a interação ente ambos os sistemas. (DINAN; CRYAN, 2017).

1.3. Comunicação entre o Trato Gastrointestinal e o Sistema Nervoso Central

O eixo intestino-cérebro é uma complexa rede de comunicação neuro-humoral que atua na manutenção e homeostase metabólica do organismo. É composto pelo sistema nervoso entérico e central, além do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, sistemas neuroendócrinos, imunológicos e a microbiota (BLISS; WHITESIDE, 2018). A maior parte do processo de sinalização e comunicação entre o ENS e SNC ocorre pela liberação de hormônios por células enteroendócrinas, estas são localizadas em toda a extensão do epitélio do TGI (XIAO *et al.*, 2018). A mucosa intestinal possui densa inervação e tem origem nos nervos vagal e esplênico. As fibras vagais tem um amplo papel na comunicação do eixo, visto que se estendem até a lâmina própria terminando na membrana basolateral das células enteroendócrinas, aqui expressa receptores para diversos hormônios intestinais (BLISS; WHITESIDE, 2018).

O nervo vago é responsável pela transmissão de informações do TGI para o SNC, isto acontece por vias parassimpáticas. Este contém vias sensoriais e motoras e é responsável pela inervação de todo o TGI, exceto pela porção distal do cólon reto e esfíncter anal. Ademais o córtex superior é capaz de influenciar o nervo vago modulando os núcleos pelo próprio tronco cerebral ativando assim a resposta do núcleo do trato solitário que transmite a informação para as regiões cerebrais superiores (MUKHTAR; NAWAZ; ABID, 2019).

O eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) é um dos principais mecanismos do sistema neuroendócrino, este controla reações ao estresse e regula diversos processos corporais, tais como digestão e sistema imune (RASKOV *et al.*, 2016). A comunicação neuroendócrina permite que o cérebro e a microbiota controlem a atividade de células intestinais, os sinais entre o sistema acontecem majoritariamente por meio de transdutoras de sinais como células enterocromafins e células dendríticas segregando assim diversas substâncias transmissoras como por exemplo o 5-HT e o hormônio liberador de corticotropina (CARABOTTI *et al.*, 2015). Os sinais são transmitidos do SNC por meio de transmissores neuroendócrinos secretados no lúmen, por neurônios células imunes e enterocromafins, podendo assim modular o comportamento da microbiota (RASKOV *et al.*, 2016). A microbiota é capaz de se comunicar diretamente com as células epiteliais do intestino por meio de sinalizações através peptídeos e monoaminas neurotransmissoras ou hormonais, para isto há a necessidade da presença de diversos neurotransmissores como 5-HT, dopamina e o fator de liberação de corticotropina (HOLZER; FARZI, 2014).

Uma forma com que a microbiota se comunica com o SNC é por meio dos receptores *tool-like* (TLR), a sinalização das vias de NF- κ B resulta na produção de citocinas pró-

inflamatórias que participam da homeostase do epitélio intestinal e são capazes de proteger da lesão epitelial (ANITHA *et al.*, 2012).

O aumento da circulação de citocinas pró-inflamatórias como *IL-6* e *IL-1 β* pode provocar a ativação do eixo HPA, doenças inflamatórias diretamente conectadas ao intestino como a Colite Ulcerativa ou doença de Crohn podem, portanto desencadear um processo de comunicação direta entre o intestino e o cérebro (DINAN; CRYAN, 2017; RUSSO *et al.*, 2017).

1.3.1. GABA principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso.

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do cérebro, é sintetizado por ácido l-glutâmico sob a catalisação do ácido glutâmico decarboxilase, é um potencial alvo terapêutico de diversas drogas para tratamentos de psicopatologias, incluindo benzodiazepínicos (MODY *et al.*, 1994). Diversas funções são atribuídas ao GABA como por exemplo a manutenção e regulação do comportamento agressivo, pressão arterial e frequência cardíaca, além de atuar na percepção da dor (CRYAN; KAUPMANN, 2005).

A atividade inibitória no sistema nervoso do GABA pode influenciar diretamente no comportamento do indivíduo, estudos sobre depressão e ansiedade mostram que a elevada produção do neurotransmissor e de seus receptores é capaz de reduzir e controlar o quadro de ansiedade e depressão, portanto, diversas drogas atuam diretamente nas vias de ativação dos receptores de GABA, (BAK; SCHOUSBOE; WAAGEPETERSEN, 2006; PETROFF, 2002).

A funcionalidade e atividade do GABA no organismo é mediada por meio de seus receptores, GABA_{A/C} e GABA_B, cada um com suas respectivas subunidades são capazes de modular a maioria das interações sinápticas inibitórias rápidas no cérebro. Os receptores GABA_A são ativados pelo neurotransmissor devido à alta concentração de Cl⁻ intracelular nos neurônios entéricos (WHITTINGTON; TRAUB; JEFFERYS, 1995).

Atualmente o GABA pode ser obtido por vias sintéticas por uso de medicação, mas diversos estudos mostram que a microbiota é capaz de sintetizar e estimular a circulação de GABA no organismos, porém ainda há certa carência de estudos sobre a possibilidade de haver trânsito do aminoácido da mucosa intestinal para o encéfalo (DINAN; CRYAN, 2017).

1.4. Probióticos

1.4.1 História da Arte

Durante toda a história há a busca por ferramentas e mecanismos capazes de proporcionar benefícios e melhorias à qualidade de vida, isso nos leva ao início do século 20 quando deu início aos estudos dos benefícios à saúde proporcionados por microrganismos vivos. Elie Metchnikoff, biólogo, microbiologista, russo foi o primeiro cientista a propor esta ideia, em 1908 (SCHOSTER; WEESE; GUARDABASSI, 2014). Metchnikoff observou uma curiosa situação onde bactérias presentes no leite produziam elementos capazes de inibir o crescimento de microrganismos patológicos (MACKOWIAK, 2013). Mais tarde, na década de 30, Minoru Shirota isolou e identificou uma cepa de gênero *Lactobacillus* que possuía a capacidade de sobreviver à passagem pelos ambientes hostis do TGI. Esta linhagem é conhecida hoje como *Lactobacillus casei Shirota*, sendo encontrada na bebida fermentada chamada de “Yakult” (BROWN *et al.*, 2005; SIEZEN; WILSON, 2010). Entre o fim da década de 1930 e o fim da década de 1950 a pesquisa nesta área perdeu o seu ritmo provavelmente devido aos conflitos de guerra que o mundo enfrentava. O interesse no estudo da microflora intestinal humana voltou a ganhar notoriedade no final da década de 1950 e início dos anos 60 com a introdução do conceito de probiótico (OZEN; DINLEYICI, 2015; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

A palavra “probiótico” deriva do grego significando “pró-vida”, a primeira menção a este nome foi em 1965, após Lilly e Stillwell, relacionaram a sobrevivência de determinados microrganismos com o efeito benéfico de seus produtos (LILLY; STILLWELL, 1965). Atualmente, de acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), os probióticos são definidos como: “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (HILL *et al.*, 2014 FAO/WHO, 2002).

1.4.2. Mecanismos de ação dos Probióticos

Para que os microrganismos probióticos exerçam o seu potencial de ação é necessário que eles cheguem vivos ao local em que irão atuar, entretanto eles se deparam com uma diversidade de ambientes hostis que são maléficos para a sua manutenção, o que pode reduzir sua viabilidade (PAPADIMITRIOU *et al.*, 2015).

Microrganismos probióticos possuem inúmeras funções para o organismo do hospedeiro, sua principal vantagem é a capacidade de modulação da microbiota na qual pode interagir e se associar à barreira epitelial de forma a beneficiar o organismo colonizado (OELSCHLAEGGER, 2010). Microrganismos previamente classificados como probióticos possuem também a capacidade de induzir a produção de vitaminas no organismo, modular a microbiota patogênica, prevenir intoxicação alimentar, melhoria na digestão, combate a candidíases além de também prevenir cárie dentária (MARKOWIAK; ŚLIZEWSKA, 2017).

Atualmente a gama de benefícios proporcionados pelos probióticos gira em torno de quatro mecanismos de ação (1) Produção de substâncias antimicrobianas; (2) Imunomodulação; (3) Exclusão competitiva; (4) Inibição da produção de toxinas bacterianas (BRANDÃO *et al.*, 1998; TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ *et al.*, 2004).

1.4.2.1. Produção de substâncias antimicrobianas

Estudos mostram que a colonização da mucosa intestinal por microrganismos probióticos apresentam a inibição da replicação de patógenos por meio da produção de bacteriocinas e outras substâncias de baixo peso molecular, tais como ácidos graxos de cadeia curta e ácido láctico (MAQUEDA *et al.*, 2008), ademais há também a capacidade da produção de antibióticos por meio destes microrganismos como por exemplo a reuterina que é um antibiótico de amplo espectro capaz de combater desde a bactérias até leveduras e protozoários (CLEUSIX *et al.*, 2008).

Outra substância produzida pelos probióticos são os ácidos biliais desconjugados, estes são potentes agentes antimicrobianos e apresentam uma atividade mais elevada quando

secretados pelos probióticos do que os sais biliais sintetizados pelo organismo hospedeiro (OELSCHLAEGER, 2010).

1.4.2.2. Modulação do sistema imune

Estes microrganismos também são capazes de modular o sistema imunológico do hospedeiro, atuando na ativação de células imunes como neutrófilos e eosinófilos, aumento da produção de anticorpos proliferação de células T e produção de citocinas (RABAH; ROSA DO CARMO; JAN, 2017).

A influência exercida pelos probióticos no sistema imunológico pode acontecer de diversas formas, e tanto microrganismos vivos quanto componentes destes podem induzir resposta, como componentes da parede celular, material genético e metabólitos (OELSCHLAEGER, 2010).

De forma geral os probióticos são capazes de aprimorar respostas imunes inatas com a produção de *IL-12* por apresentadores de antígenos e subsequente ativação de células *natural killer* hospedeiras além da promoção de respostas celulares tipo I (ASHRAF; SHAH, 2014). Os probióticos podem também modular a resposta imune adquirida por meio da secreção de IgA, ativação de linfócitos B e células T (PIQUÉ; BERLANGA; MIÑANA-GALBIS, 2019).

As bactérias probióticas também são capazes de modular a resposta anti-inflamatória do hospedeiro. Diferentes efeitos podem ser desencadeados, como a expansão da resposta t-regulatória, aprimoramento da função da barreira epitelial no intestino, atenuação da disfunção causada por citocinas pró-inflamatórias (DONATO *et al.*, 2010).

1.4.2.3. Exclusão competitiva

Os componentes da microbiota conectam em locais receptores específicos na mucosa intestinal, da mesma forma é feito por microrganismos patológicos, algumas cepas competem mais ativamente pelos locais receptores, resultando na exclusão de organismos patogênicos, isto se dá pela redução de pH luminal, concorrência por fontes nutricionais e produção de substâncias semelhantes à bacteriocinas (BERMUDEZ-BRITO *et al.*, 2012).

Diversos metabólitos produzidos por cepas probióticas possuem a capacidade de impedir a colonização de microrganismos patológicos. Ácidos orgânicos, bacteriocinas,

peróxido de hidrogênio, aminas, entre outras, foram relatados em interações capazes de regular a proliferação de microrganismos selecionados (PLAZA-DIAZ *et al.*, 2019).

1.4.3. Microrganismos Probióticos na Modulação do eixo Intestino-Cérebro

Muitos estudos demonstram que as bactérias probióticas são capazes de produzir substâncias neuroativas, as quais exercem influência sobre o eixo cérebro intestino, dentre elas as BLs como alguns membros de *Lactobacillus* e de *Lactococcus*. O GABA é um neurotransmissor inibitório do SNC, e sua disfunção acarreta sintomas de ansiedade e depressão (Barrett *et al.*, 2012). Bravo e colaboradores (2011) sugerem que *Lactobacillus* JB1 foi capaz de aumentar a expressão relativa do mRNA dos receptores de GABA $A\alpha 1$ e GABA $A\alpha 2$ o que permite afirmar que esta linhagem possui a capacidade de modular o sistema GABAérgico e conseqüentemente reduzir e controlar os efeitos do estresse em modelo murino.

Em 2013, Foster e Mcvey observaram que animais tratados com a linhagem probiótica *Lactobacillus rhamnosus* tiveram uma melhora no quadro depressivo, e também alteraram a expressão de receptores de GABA em regiões do SNC relacionadas ao estresse (FOSTER *et al.*, 2013). Além disso, alguns estudos mostraram que a ingestão linhagens específicas de BL's poderiam não apenas modular o comportamento emocional como também a cognição (Sullivan *et al.*, 2009, Bravo *et al.*, 2011, Davari *et al.*, 2013).

Ao estudar o eixo cérebro-intestino, torna-se necessário a avaliação de alguns genes, como as subunidades do receptor NMDA (*Grin2a* e *Grin2b*) que desempenha papel na plasticidade das sinapses e medeiam um componente lento permeável ao cálcio da transmissão sináptica excitatória no sistema nervoso central (YAWALKAR; CHANGOTRA; GUPTA, 2018). Também é necessária a avaliação dos genes ligados as vias de síntese de neurotransmissores como a via das catecolaminas que ocorre pela catálise do triptofano através de *Th*, *Tdo2* e *Ido1*, estes são responsáveis pela fase inicial da via da quinurenina, que posteriormente da origem aos neurotransmissores da classe das catecolaminas como a dopamina, epinefrina e norepinefrina (CAMARILLO *et al.*, 2020; MUKHERJEE *et al.*, 2019). A serotonina também representa importância no estudo do eixo, esta atua na regulação do humor, apetite atividade motora, sono e funções cognitivas, sua síntese é feita através do triptofano e se inicia pela Triptofano hidroxilase 1 (*Thp1*) (MAO *et al.*, 2019). Por fim a

análise dos receptores GABA_A subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 2$ estes são canais de cloreto dependentes de ligantes (AUTERI; ZIZZO; SERIO, 2015).

Diante do exposto, este trabalho, propõe um estudo em modelo murino para a avaliação da modulação da administração a longo prazo de cepas probióticas nos genes relacionados ao eixo intestino-cérebro.

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente há um crescimento significativo de transtornos neurológicos na população mundial desde a depressão até doenças significativamente degradantes. Os probióticos vêm sendo amplamente estudados com o objetivo de obter um tratamento adjuvante para ser usado às terapias convencionais em diversas doenças, como quadros psicopatológicos, através da produção de metabólitos. Considerando essas informações, este trabalho, propõe um estudo em modelo murino, visando avaliar a capacidade de probióticos de atuarem na modulação do eixo intestino-cérebro e abrir precedentes para a investigação de como estas linhagens podem auxiliar no combate à transtornos neurológicos significativos.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito terapêutico de linhagens probióticas no eixo intestino cérebro em camundongos saudáveis.

3.2. Objetivos Específicos

- a) Quantificar a produção de GABA através de cromatografia líquida de alta eficiência entre 9 linhagens probióticas, *Lactobacillus casei* BL23, *L. paracasei* LVdg, *L. plantarum* ABX4.1, *L. rhamnosus* H1, *L. paracasei* ST11, *L. plantarum* B7, *L. rhamnosus* D1, *L. delbruekii* CNRZ 327, *Lactococcus lactis* NCDO2118, *Propionibacterium freudenreichii* 129 e determinar quais possuem maior produção de GABA.
- b) Avaliar os efeitos da administração das cepas com maior produção de GABA em modelo murino.
- c) Avaliar a expressão relativa do mRNA, por qPCR de: *Th*, *Ido1*, *Tdo2*, *Dat1*, *Grin2A*, *Grin2B*, *GABAA α 1* e *GABAA α 2*, no hipocampo dos animais que consumiram as cepas com maior produção de GABA
- d) Avaliar a expressão a expressão relativa dos genes *Tjp1*, *Tjp2*, *Cld1*, *Ocln*, *Il-10*, *Il1 β* , *Il-6*, *Tph1*, *Ido1*, *Tdo2*, *GABAA α 1* e *GABAA α 2* em amostras do cólon dos animais que consumiram as cepas com maior produção de GABA, por meio da técnica de PCR quantitativo (RT-PCR);

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Triagem de linhagens probióticas para a produção de ácido gama-aminobutírico (GABA)

4.1.1. Linhagens Bacterianas

As linhagens bacterianas *Lactobacillus casei* BL23, *L. paracasei* LVdg, *L. plantarum* ABX4.1, *L. rhamnosus* H1, *L. paracasei* ST11, *L. plantarum* B7, *L. rhamnosus* D1, *L. delbruekii* CNRZ 327, *Lactococcus lactis* NCDO2118, *Propionibacterium freudenreichii* 129 foram cedidas pelo Prof. Doutor Vasco Azevedo LGCM/UFMG, pelo Dr. Gwénaél Jan STLO/INRA e pelo Dr. Leonardo Acúrcio UFMG.

4.1.1.1. Condições de cultivo

As linhagens de *Lactobacillus ssp.* foram cultivadas em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) por 24 horas à 37°C, a *Lactococcus ssp.* em M-17 suplementado com Glicose (0,5 % p/v) por 24 horas à 30°C e a *Propionibacterium ssp.* em Yeast Extract sodium Lactate (YEL) por 48 horas à temperatura de 30°C. Para avaliar a produção de GABA e para o ensaio *in vivo*, foi realizado o protocolo de cultivo de acordo com Dhakal e colaboradores (2012) com a adição de 1% de glutamato – L de sódio monohidratado e 1,25% de D – glucose no meio de cultura. As linhagens foram cultivadas de acordo suas condições de cultivo até a fase estacionária. O meio de cultura com glutamato foi autoclavado à 120°C por 15 minutos. Para a adição de 1,25% de glicose, foi filtrada em filtro 0,22µm uma solução de glicose 50%, e então adicionada somente no momento do inóculo.

4.1.2. Extração de GABA e Glutamato

Para a extração de GABA utilizamos o protocolo de Kanwal e Incharoensakdi, 2016, com modificações. Para tanto, 2,0 ml da cultura foi centrifugada a 10.000 xg por 10 minutos, temperatura ambiente. Foi coletado 200µL do sobrenadante e ressuspenso em 1,8mL de metanol, esta mistura foi incubada por 16 horas a temperatura ambiente e então

homogeneizada em vortex por 2 minutos. A amostra foi centrifugada a 10.000xg por 10 minutos a 4°C e então a fase orgânica foi seca em concentrador a vácuo (Speed Vac) por 2 horas a 45°C. A fase orgânica foi ressuspensa em 200 µL de água ultrapura e 50µL de clorofórmio, e então centrifugada a 10.000xg por 10 minutos a 4°C. A fase superior foi coletada e diluída em HCl para a concentração final de 0,1M, e então filtrada em filtro Millipore de 0,45µm e armazenada a -80°C até o momento da dosagem por HPLC.

4.1.2.1. Dosagem de GABA e Glutamato por Cromatografia Líquida de Alta Performance (High performance liquid chromatography – HPLC)

A dosagem de GABA foi feita de acordo com Freitas-Silva e colaboradores (2009). A derivatização pré-coluna foi realizada conforme descrito previamente por Mengerink e cols. (2002) e Kutlán & Molnár-Perl (2003). A reação de derivatização foi feita misturando-se 20 µL de amostra, 4 µL de de ortoftaldeído (OPA) metanólico (5 mg/mL) preparado no dia do ensaio, 15 µL de tampão borato (pH 9,9) e 1 µL de ácido 3-mercaptopropiônico (MPA). A solução resultante foi levemente agitada e injetada no sistema cromatográfico após um minuto, à temperatura ambiente. A fase móvel isocrática consistiu de uma solução 0,05 M de acetato de sódio, tetrahidrofurano e metanol (50:1:49 v/v), pH 4,0. O sistema utilizado foi o cromatógrafo Shimadzu (LC10AD, Tokyo, Japan) com válvula injetora de 20 µL (Rheodyne 7725-I, California, USA) e detector fluorescente (FLD - Shimadzu spectrofluorometric detector RF-551, Tokyo, Japan) acoplado a uma bomba LC-10. Os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados foram de 337 e 454 nm, respectivamente. Uma coluna cromatográfica analítica de fase reversa C18 (150 mm×4,6 mm, ID) e pré-coluna (RT 250-4 E. Merck, Darmstadt E.R., Germany) foram utilizadas nas análises. Glutamato e GABA foram eluídos em um tempo inferior a 9 minutos e as concentrações desses neurotransmissores nas amostras de meio de cultura foram calculadas de acordo com a média das áreas dos picos e respectivas curvas padrões. No caso deste experimento aqui descrito, o tempo de retenção do pico de GABA foi de 5,4 minutos e do glutamato de 1,9 minutos. Um integrador (Shimadzu C-R7Ae plus) contendo um programa de análise de dados acoplado ao sistema cromatográfico forneceu a área dos picos dos cromatogramas a partir da intensidade de fluorescência.

4.2. Animais

Para este trabalho foram utilizadas fêmeas de camundongos (*Mus musculus*) C57 black/6, com idade inicial de 4 semanas. Os animais foram submetidos por período de ambientação de quatro semanas no biotério de experimentação do departamento de Genética Ecologia e Evolução (GEE) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) com início do protocolo de experimentação na oitava semana de vida. O biotério do GEE possui todos os parâmetros de segurança e conforto para os animais previsto pelo Comissão de Ética na Utilização de Animais, tais como controle de luminosidade com ciclo claro-escuro de 12 horas, presença de Rack ventilada e controle de temperatura. Durante todo o período experimental os animais tiveram acesso *ad libitum* à água e ração.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, protocolo de pesquisa n° (363/2018).

4.2.1. Delineamento Experimental

Os animais foram acondicionados em microisoladores durante todo o período do experimento. Os camundongos foram distribuídos de forma aleatória em 5 grupos experimentais os quais são identificados na tabela X.

Diariamente foram administrados os tratamentos por *continuous feeding*, recebendo doses de 40 mL/dia de acordo com o tratamento direcionado a cada grupo durante vinte e um dias.

Houve coleta de fezes destes animais com intervalo de sete dias contando a partir do dia zero, contabilizando um total de quatro coletas para análise de microbioma.

Ao fim dos vinte e um dias de tratamento os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical, seguido de dissecação do cérebro, este por sua vez foi acondicionado em tubo de centrifugação de 15 mL contendo 2,5 mL de RNA later (Thermo Fisher Scientific), posteriormente por meio de incisão abdominal foi realizada a coleta do cólon, este foi dividido em duas partes, a proximal foi alocada em microtubo de centrifugação contendo 0,2 mL de RNA later (Thermo Fisher Scientific), para a realização de ensaio de

PCR em tempo real e a região distal também alocada em microtubo foi submergida em Nitrogênio Líquido (NL₂) para análise proteômica. Do cólon realizamos a quarta coleta de fezes do microbioma. Todas as amostras obtidas durante a eutanásia foram armazenadas em freezer -80° para posterior análise.

Tabela 1: Identificação dos grupos experimentais de acordo com o tratamento administrado

Grupos	Tratamentos
1 - Naive	H ₂ O
2 - M17	Meio de cultura clássico para crescimento de <i>Lactococcus</i> spp.
3 - MRS	Meio de cultura clássico para crescimento de <i>Lactobacillus</i> spp.
4 - NCDO 2118	Cultura de <i>Lactococcus lactis</i> NCDO 2118 em M17
5 - <i>L. delbruekii</i> 327	Cultura de <i>Lactobacillus delbruekii</i> 327 em MRS

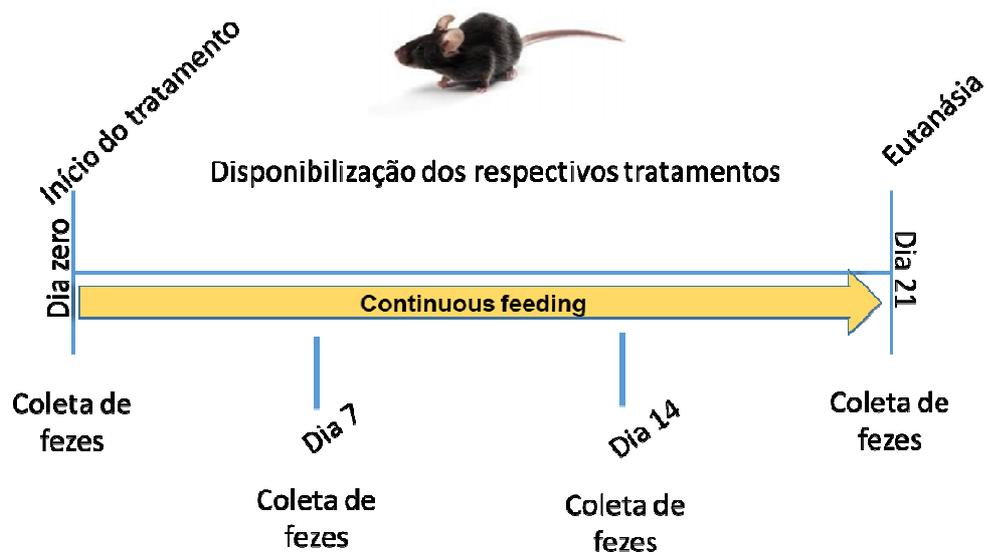


Figura 1: Delineamento Experimental

4.3. Parâmetros avaliados

4.3.1 Evolução do peso dos animais

Os animais foram pesados diariamente ao longo de todo o período experimental (21 dias), para tal foi utilizada balança semi-analítica.

4.3.2. PCR em Tempo Real

4.3.2.1. Extração e Tratamento de RNA Total do Hipocampo

Após a eutanásia no vigésimo primeiro dia, as amostras de cérebro (Hipocampo) e as amostras do cólon foram isoladas e armazenadas em freezer -80°C.

Após isolar a seção do hipocampo, o RNA total foi obtido utilizando o Mini-kit RNA Purelink (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific) de acordo com as orientações do fabricante.

A integridade e quantificação foram feitas respectivamente por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em corrida à 70 V por 50 minutos, e análise espectrofotométrica em nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, Estados Unidos), onde foram consideradas as razões de absorbância 280/260 e 260/230 nm, para determinar a pureza das amostras.

As amostras obtidas da extração foram tratadas com DNaseI (Invitrogen, Carlsbade, United States) e posteriormente foram submetidas a transcrição reversa utilizando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. (Applied Biosystems, Foster City, United States), seguindo as orientações do fabricante.

4.3.2.2. Extração e Tratamento de RNA Total do Cólon

O Cólon foi submetido ao processo de extração de RNA utilizando Trizol, para tal foi coletado de cada, uma porção de cerca de 3 mm e colocada em microtubo de centrifugação com 0,25 mL (p/v) de Trizol (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific), estas foram com o auxílio de homogeneizador de tecidos (ULTRA TURRAX IKA T25 Digital) trituradas e incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente, seguido da adição de 100 µl de

Clorofórmio (Sigma-Aldrich), as amostras foram levadas ao vórtex para homogeneização e centrifugadas à 12000 xg por 15 minutos à 4° C, neste ponto realizamos a coleta da fase aquosa superior em um novo tubo e adicionamos para a precipitação do RNA 250 µl de álcool isopropílico e as amostras foram centrifugadas a 12000 xg a 4°C por 10 minutos.

Após a precipitação do RNA, o sobrenadante foi descartado e adicionamos 500 µl de álcool etílico a 70% (v/v) e centrifugamos por mais 10 minutos a 12000 xg a 4°C, descartamos o sobrenadante e ressuspendemos o pellet final em 50 µl de água livre de RNase.

A integridade e quantificação foram feitas respectivamente por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em corrida à 70 V por 50 minutos, e análise espectrofotométrica em nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, Estados Unidos), onde foram consideradas as razões de absorbância 280/260 e 260/230 nm.

As amostras obtidas da extração foram tratadas com DNaseI 1 U (Invitrogen, Carlsbade, United States) e posteriormente submetidas a transcrição reversa utilizando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. (Applied Biosystems, Foster City, United States), seguindo as orientações do fabricante.

4.3.2.3 Análise da Expressão Relativa por PCR em Tempo Real

As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas utilizando o SYBR Green Real-Time PCR Master Mix (Ambion – Thermo Fisher Scientific) e primers gene-específicos para *Ido1* Donley et al., (2016), *Tdo2* Cicco, (2019), *Grin2a*, *Th* Jeong et al., (2016), *Grin2b* Wei et al., (2016), *Gabaα1*, *Gabaα2* Bravo et al., (2011), *Zo2* Lee et al., (2017), *Muc2* Wlodarska et al., (2011), *Zo1*, *Cld1* Tokumasu et al., (2016), *Ocln* Hu et al., (2016), *Il-10* Patial et al., (2016), *Il-6*, *Il-1β* Giulietti et al., (2001), *Thp1* Hata et al., (2017). As reações foram referenciadas por meio dos genes *Housekeeping β-actin* e *GAPDH* descritos por Giulietti et al. (2001). Os resultados são mostrados graficamente como alterações na expressão gênica, usando as médias e desvios padrão da quantidade de expressão de citocinas alvo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de acordo com Hellemans, Mortier, De Paepe, Speleman e Vandesompele (2007).

As reações foram otimizadas de acordo e adaptado com o trabalho de Cicco (2019) descritas nas tabelas 2, 3 e 4, os resultados obtidos dos grupos experimentais foram

estudados em comparativo com o grupo Naive, o qual não recebeu qualquer tipo de tratamento.

Tabela 2: Primers e condição de amplificação genes Housekeeping.

	Molécula	Símbolo	Primer	Sequência (5' - 3')	Conc. (nM)	Qtd. cDNA (ng)	Referência
Primers	Actin, beta	<i>b-actin</i>	b-actinF	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	250	20.00	Giulietti et al., 2001
			b-actinR	CAATAGTGATGACCTGGCCGT			
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Gapdh</i>	GapdhF	TCACCACCATGGAGAAGGC	250	20.00	Giulietti et al., 2001
			GapdhR	GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA			

Tabela 3: Primers e condição de amplificação das amostras do Hipocampo.

	Molécula	Símbolo	Primer	Sequência (5' - 3')	Conc. (nM)	Qtd. cDNA (ng)	Referência
Primers	Tyrosine hydroxylase	<i>Th</i>	ThF	AGTGCCAGAGAGGACAAGGT	250	200	Jeong et al., 2016
			ThR	GTCCAGGTCAGGGTCAAACCT			
	Indoleamine 2,3-dioxygenase 1	<i>Ido1</i>	Ido1F	CCTTCTGGGAATAAAACACGAGG	250	20.00	Donley et al., 2016
			Ido1R	CTAAGAAGAAAAGGAAGTTCCG			
	Tryptophan 2,3-dioxygenase	<i>Tdo2</i>	Tdo2F	TGGCAATTACTTGCAGTTGGA	250	200	Cicco, 2019
			Tdo2R	GTGCTCGTCATGGATTTTGTC			
	Glutamate receptor, ionotropic, NMDA2A (epsilon 1)	<i>Grin2a</i>	Grin2aF	GGGATGACCAACGCTTAGTT	250	20.00	Jeong et al., 2016
			Grin2aR	CCTCAAGGATGACCGAAGAT			
	Glutamate receptor, ionotropic, NMDA2B (epsilon 2)	<i>Grin2b</i>	Grin2bF	CACCTTCATCTGTGAACATCTC	250	20.00	Wei et al., 2016
			Grin2bR	TATAGCTACTCCGTGGATACAG			
	GABA receptor A α 1	<i>GABAA1</i>	GABAA1F	AAAAGCGTGGTTCCAGAAAA	250	20.00	Bravo et al., 2011
			GABAA2R	GCTGGTTGCTGTAGGAGCAT			
	GABA receptor A α 2	<i>GABAA2</i>	GABAA2F	GCTACGCTTACACAACCTCAGA	250	20.00	Bravo et al., 2011
			GABAA2R	GACTGGCCCAGCAAATCATACT			

Tabela 4: Primers e condição de amplificação das amostras do Cólon

	Molécula	Símbolo	Primer	Sequência (5' - 3')	Conc. (nM)	Qtd. cDNA (ng)	Referência
Primers	Claudin 1	<i>Cld1</i>	Cld1F	CTGGAAGATGATGAGGTGCAGAAGA	250	20.00	Tokumasu et al., 2016
			Cld1R	CCACTAATGTCGCCAGACCTGAA			
	Occludin	<i>Ocl</i>	OclF	CAGCCTTCTGCTTCATCG	250	20.00	Hu et al., 2016

		OclR	GTCGGGTTCACTCCCATTA			
Tight junction protein 1	<i>Tjp1</i>	Tjp1F	GACCTTGAGCAGCCGTCATA	250	20.00	Tokumasu et al., 2016
		Tjp1R	CCGTAGGCGATGGTCATAGTT			
Tight junction protein 2	<i>Tjp2</i>	Tjp2F	GGAGACCAGATTCTGAAGGTGAACACAC	250	20.00	Lee et al., 2017
		Tjp2R	ACCTTTGGGGATTTCTAGCAGGTAGAGGAC			
Mucin 2	<i>Muc2</i>	Muc2F	GCTGACGAGTGGTTGGTGAATG	250	20.00	Wlodarska et al., 2011
		Muc2R	GATGAGGTGGCAGACAGGAGAC			
Interleukin 1 beta	<i>Il1b</i>	Il1bF	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	250	200	Giulietti et al., 2001
		Il1bR	GATCCACACTCTCCAGCTGCA			
Interleukin 6	<i>Il6</i>	Il6F	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	250	200	Giulietti et al., 2001
		Il6R	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA			
Interleukin 10	<i>Il10</i>	Il10F	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	250	200	Patial et al., 2016
		Il10R	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG			
Tryptophan hydroxylase 1	<i>Tph1</i>	Tph1F	ACTGCGACATCAGCCGAGAA	250	20.00	Hata et al., 2017
		Tph1R	CGCAGAAGTCCAGGTCAGAAATC			
Tryptophan 2,3-dioxygenase	<i>Tdo2</i>	Tdo2F	TGGCAATTACTTGCAGTTGGA	250	200	Cicco, 2019
		Tdo2R	GTGCTCGTCATGGATTTTGTTT			
Indoleamine 2,3-dioxygenase 1	<i>Ido1</i>	Ido1F	CCTTCTGGGAATAAAACACGAGG	250	20.00	Donley et al., 2016
		Ido1R	CTAAGAAGAAAAGGAAGTTCCG			
GABA receptor A α 1	<i>GABAA1</i>	GABAA1F	AAAAGCGTGGTTCCAGAAAA	250	200	Bravo et al., 2011
		GABAA2R	GCTGGTTGCTGTAGGAGCAT			
GABA receptor A α 2	<i>GABAA2</i>	GABAA2F	GCTACGCTTACACAACCTCAGA	250	200	Bravo et al., 2011
		GABAA2R	GACTGGCCCAGCAAATCATACT			

4.4. Análises Estatísticas

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. Os dados paramétricos foram analisados usando ONE-WAY ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey ou Sidak. Gráficos e análises estatísticas foram realizados no GraphPad Prism versão 8.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre as cepas e foram indicados da seguinte forma: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5. RESULTADOS

5.1. Dosagem de GABA

A tabela 5 mostra as concentrações em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de GABA e Glutamato. Após comparação dos resultados foi observado que as linhagens que produzem maior quantidade de GABA quando inoculadas em meio de cultura clássico suplementados com 1% de glutamato e 1,25% de glicose, foram a *Lactococcus lactis* NCDO 2118 que

produziu 0,4203 mg/mL e a *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ 327 que produziu 0,3925 mg/mL. Das 10 linhagens testadas somente a *Lactobacillus plantarum* ABX4.1 e a *Lactobacillus rhamnosus* H1 não produzem GABA. Sendo assim, selecionamos duas linhagens para trabalhar, a *L. lactis* NCDO 2118 e *L. delbrueckii* CNRZ 327.

Tabela 5: Concentração de GABA e Glutamato em µg/µL.

Concentração de GABA e glutamato (mg/mL)		
Linhagens	GABA	Glutamato
<i>Lactobacillus plantarum</i> ABX4.1	0,0000	16,3803
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> H1	0,0000	18,1195
<i>Lactobacillus paracasei</i> LVdg	0,0362	10,1578
<i>Lactobacillus casei</i> BL23	0,0174	19,6308
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> CNRZ327	0,3925	16,6241
<i>Lactobacillus plantarum</i> B7	0,0785	23,1799
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> D1	0,0884	15,1329
<i>Lactobacillus paracasei</i> ST11	0,0970	18,5846
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> 129	0,0421	19,6985
<i>Lactococcus lactis</i> NCDO2118	0,4203	13,5109

5.2. Avaliação da Variação de Peso

Durante o período experimental, diariamente os animais foram pesados conforme pode ser visualizado nas figuras 2 e 3. Os animais tratados com as duas linhagens probióticas tiveram uma variação positiva de aproximadamente 10% quando se comparado o início e fim do período experimental, a progressão diária do peso dos animais em ambos os grupos tratados com as cepas probióticas se manteve linear ao longo de todo o período experimental. Os animais que receberam como tratamento apenas o meio de cultura tiveram

redução de aproximadamente 5% do peso em relação ao primeiro dia de tratamento, mas a progressão do peso se manteve linear ao longo de todo o período experimental.

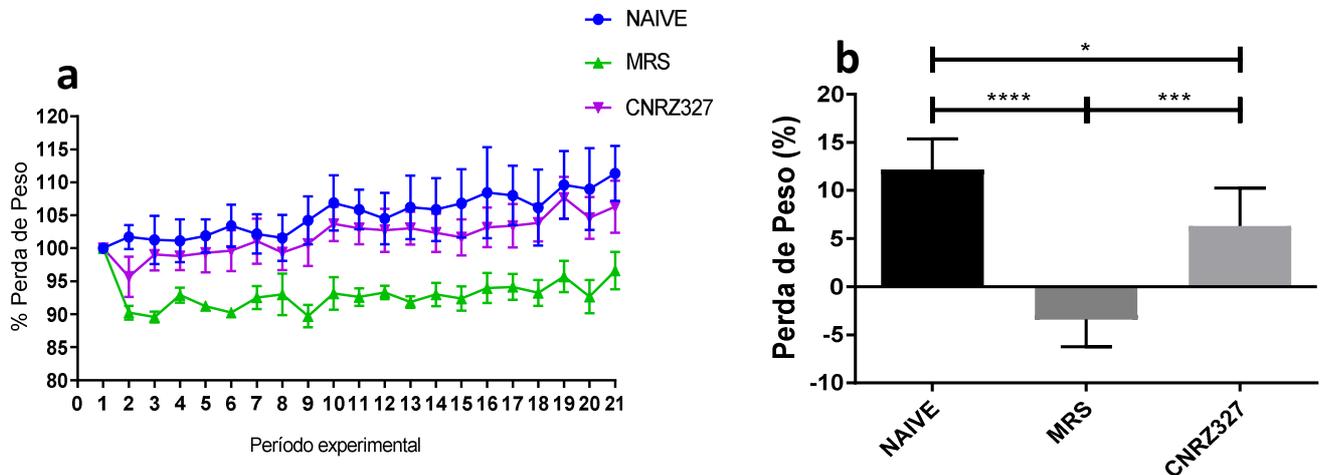


Figura 2: Gráfico de variação de peso durante o período experimental de camundongos saudáveis tratados com meio MRS, Cultura de *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ327 a 1×10^8 UFC/mL e água (Naive). a) Variação de peso contínua durante 21 dias, O teste two-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey foram usados para as múltiplas comparações entre os grupos (n= 4-8). b) Porcentagem de variação do peso do último dia de tratamento com o primeiro dia, O teste one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey foram usados para as múltiplas comparações entre os grupos (n= 4-8).

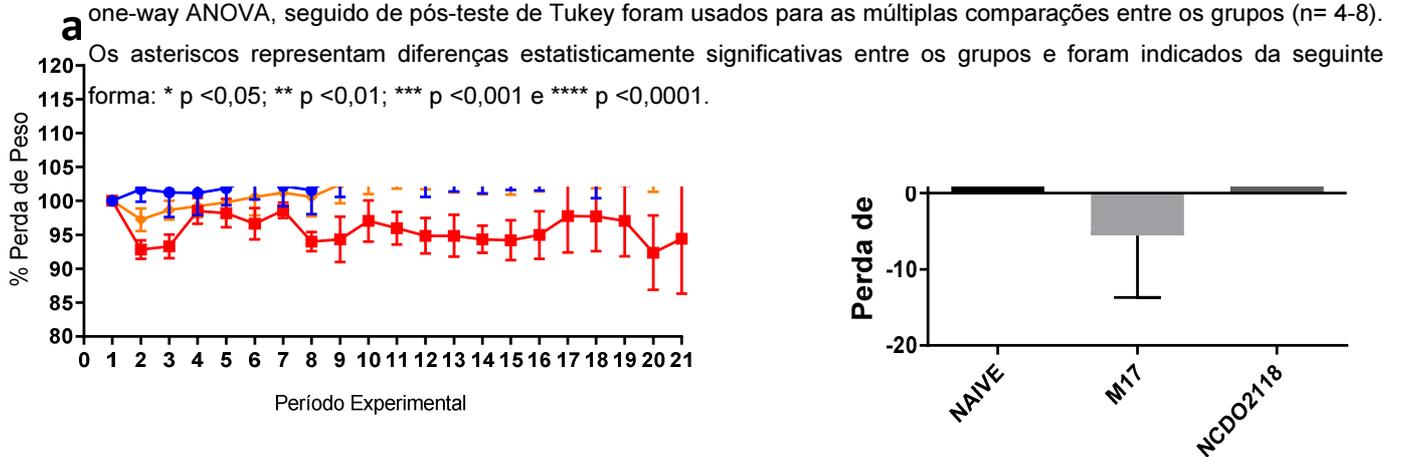


Figura 3: Gráfico de variação de peso durante o período experimental de camundongos saudáveis tratados com meio M17, Cultura de *Lactococcus lactis* NCDO2118 a 1×10^8 UFC/mL e água (Naive). a) Variação de peso contínua durante 21 dias, O teste two-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey foram usados para as múltiplas comparações entre os grupos (n= 4-8). b) Porcentagem de variação do peso do último dia de tratamento com o primeiro dia, O teste one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey foram usados para as múltiplas comparações entre os grupos (n= 4-8). Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e foram indicados da seguinte forma: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 e **** p < 0,0001.

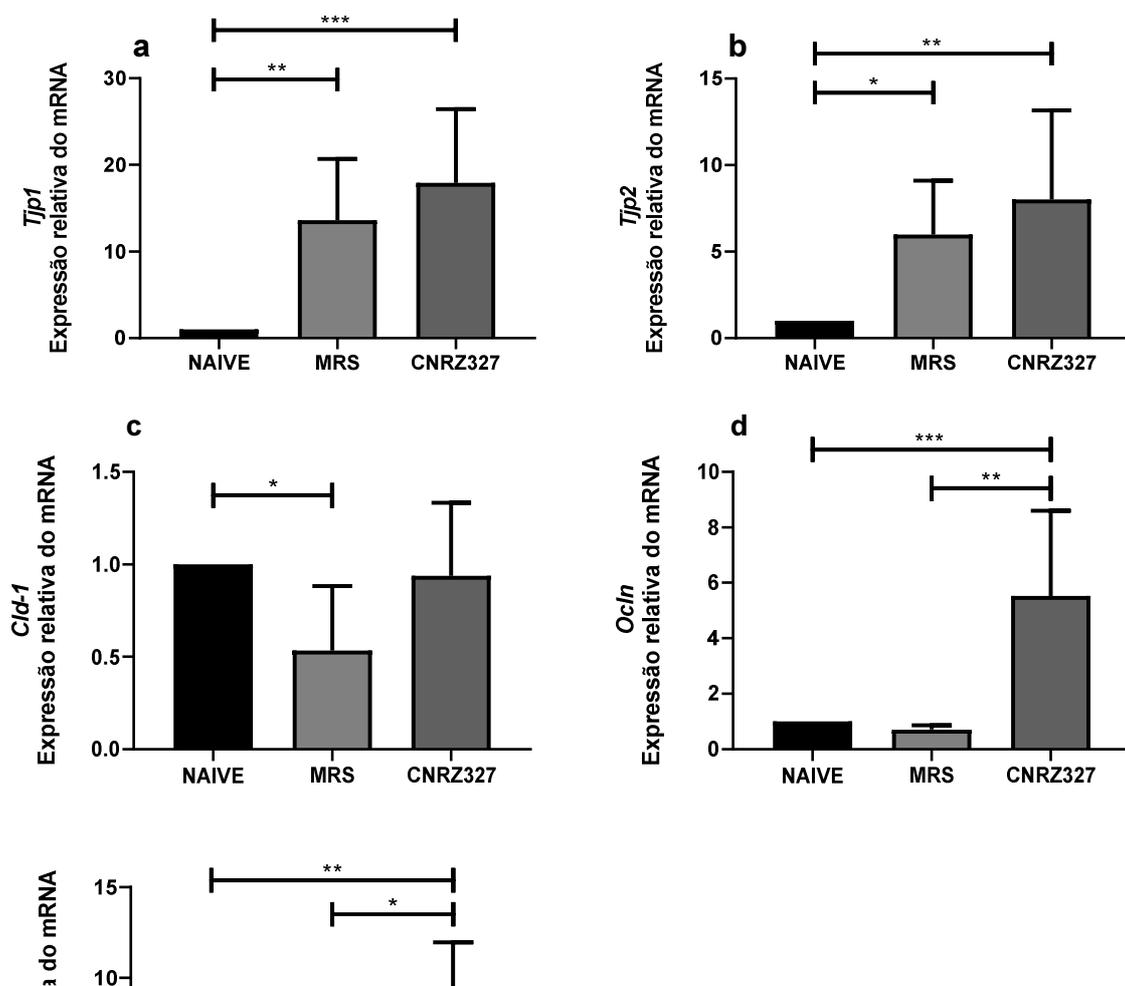
5.3. Expressão Relativa do mRNA por RT-qPCR

5.3.1. Expressão Relativa do mRNA da Mucosa do Cólon

5.3.1.1 Barreira Epitelial

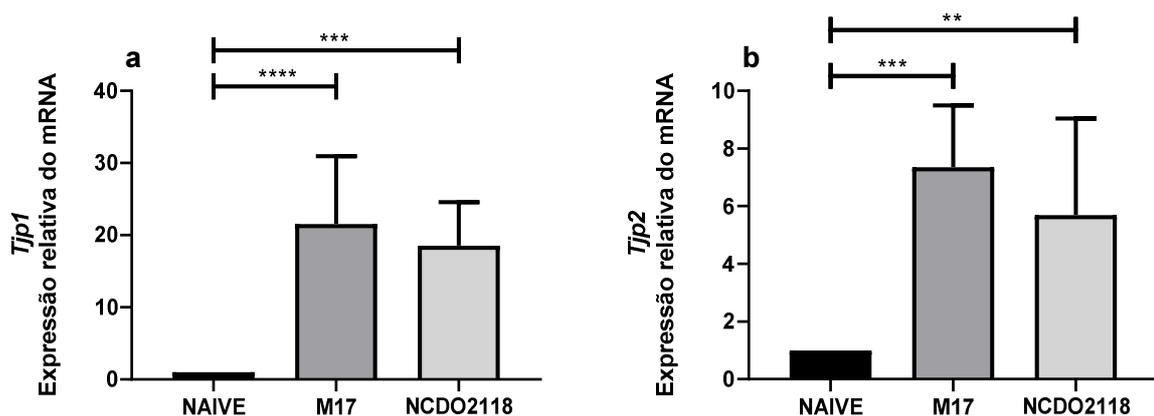
5.3.1.1.1. *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ327

Com intuito de investigar a modulação da barreira epitelial, após o consumo de CNRZ327, avaliamos por RT-qPCR os genes *Tjp1*; *Tjp2*; *Ocln*; *Cld1* e *Muc2* (figura 4). Vimos que houve um aumento significativo da expressão dos genes *Tjp1* ($p < 0,05$), *Tjp2* ($p < 0,01$), *Ocln* ($p < 0,001$) e *Muc2* ($p < 0,01$), em relação ao grupo controle, podemos observar também que este aumento da expressão é visualizado no grupo tratado apenas com o meio de cultura MRS, em *Tjp1* e *Tjp2* ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) em *Ocln* e *Muc2* os níveis de expressão se mantêm próximos ao grupo controle. Não houve aumento dos níveis de expressão do gene *Cld1*.



5.3.1.1.2. *Lactococcus lactis* NCDO2118

Com intuito de investigar a modulação da barreira epitelial, após o consumo de NCDO2118, avaliamos por RT-qPCR os genes *Tjp1*; *Tjp2*; *Ocln*; *Cld1* e *Muc2* (figura 5) vimos que houve um aumento significativo da expressão dos genes *Tjp1* ($p < 0,001$) e *Tjp2* ($p < 0,01$), *Ocln* ($p < 0,05$) e *Muc2* ($p < 0,05$) para o grupo controle, o mesmo pode ser observado no grupo tratado com o meio de cultura M17, em *Tjp1* e *Tjp2* a expressão foi superior ao grupo tratado com a cepa probiótica, mas não houve diferença estatística, ao comparar com o controle vimos que houve aumento significativo ($p < 0,0001$ e $p < 0,001$ respectivamente), em *Ocln* e *Muc2* o grupo tratado com M17 não teve aumento da expressão. Não houve aumento dos níveis de expressão do gene *Cld1*.



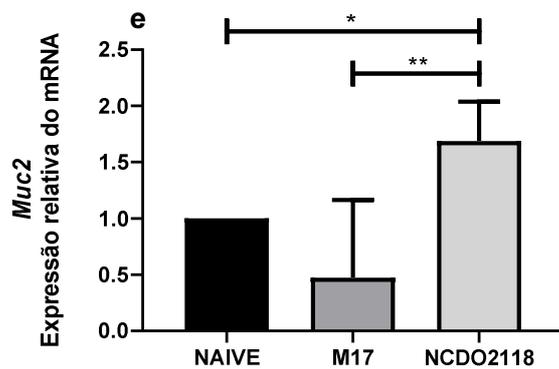


Figura 5: Expressão relativa do mRNA dos genes envolvidos na integridade da barreira epitelial, a) *Tjp1*; b) *Tjp2*; c) *Cld 1*; d) *Ocln*, e) *Muc 2*, na mucosa do cólon de camundongos saudáveis tratados com meio M17, *Lactococcus lactis* NCDO2118 e água (Naive) durante vinte e um dias. Os níveis de expressão foram monitorados por RT-qPCR. O teste one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey foram usados para as múltiplas comparações entre os grupos (n=8). Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e foram indicados da seguinte forma: * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001 e **** p <0,0001.

5.3.1.2 Genes relacionados a resposta inflamatória

5.3.1.2.1. *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ327

Com intuito de investigar a modulação de citocinas relacionadas a resposta inflamatória após o consumo de CNRZ327, avaliamos por RT-qPCR os genes *Il-6*; *Il-1 β* e *Il-10* (figura 6) vimos que houve um aumento significativo de *Il10* ($p < 0,0001$) *Il1 β* ($p < 0,05$) e *Il6* ($p < 0,01$) no grupo que recebeu a cepa probiótica, enquanto o grupo tratado apenas com o meio de cultura teve um certo aumento da expressão, mas não foi significativo.

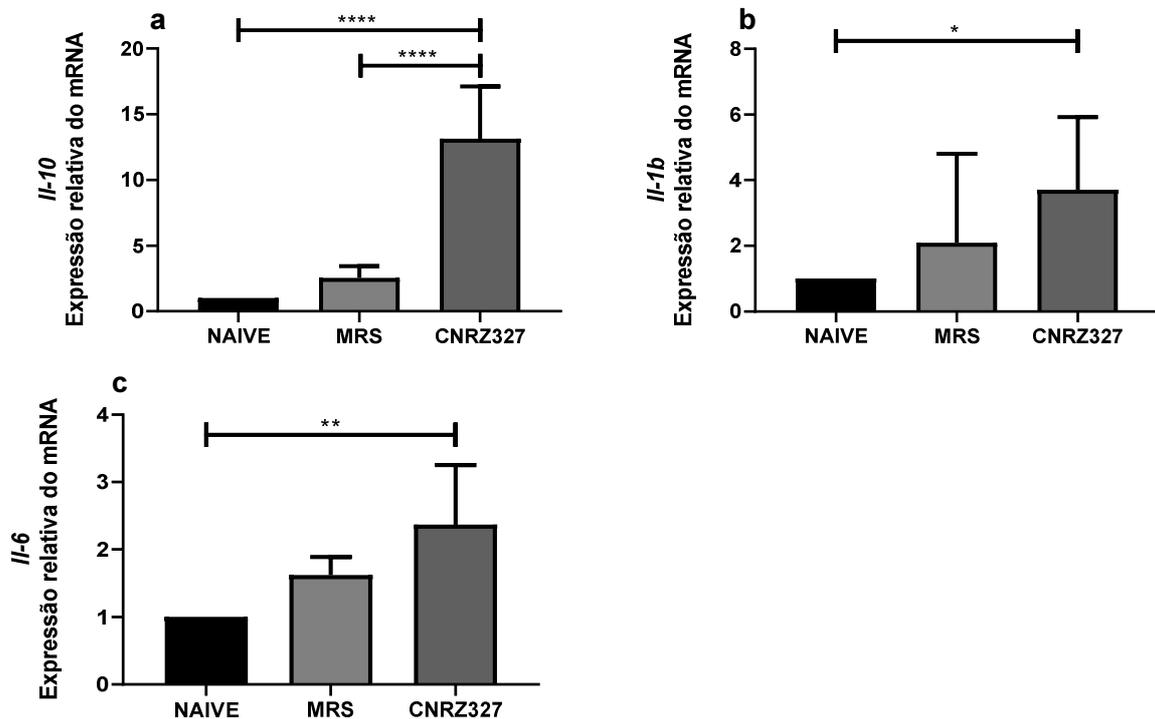


Figura 6: Expressão relativa do mRNA dos genes de citocinas relacionadas diretamente à resposta inflamatória, a) *Il-10*; b) *Il-1 β* ; c) *Il-6*, na mucosa do cólon de camundongos saudáveis tratados com meio MRS, *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ327 e água (Naive) durante vinte e um dias. Os níveis de expressão foram monitorados por RT-PCR. O teste one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey foram usados para as múltiplas comparações entre os grupos (n=8). Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e foram indicados da seguinte forma: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 e **** p < 0,0001.

5.3.1.2.2. *Lactococcus lactis* NCDO2118

Com intuito de investigar a modulação de citocinas relacionadas a resposta inflamatória após o consumo de NCDO2118, avaliamos por RT-qPCR os genes *Il-6*; *Il-1 β* e

Il-10 (figura 7) vimos que houve um aumento significativo da expressão de *Il-10* comparado ao controle ($p < 0,01$) e ao meio de cultura ($p < 0,05$), a expressão de *Il-1 β* aumentou consideravelmente no grupo tratado com M17 comparado a ambos os demais grupos ($p < 0,0001$) e no grupo tratado com NCDO2118 a expressão foi aumentada quando comparado ao controle ($p < 0,01$).

Na avaliação de *Il-6* vimos o aumento da expressão no grupo NCDO2118 para o grupo controle ($p < 0,05$) e também no grupo M17.

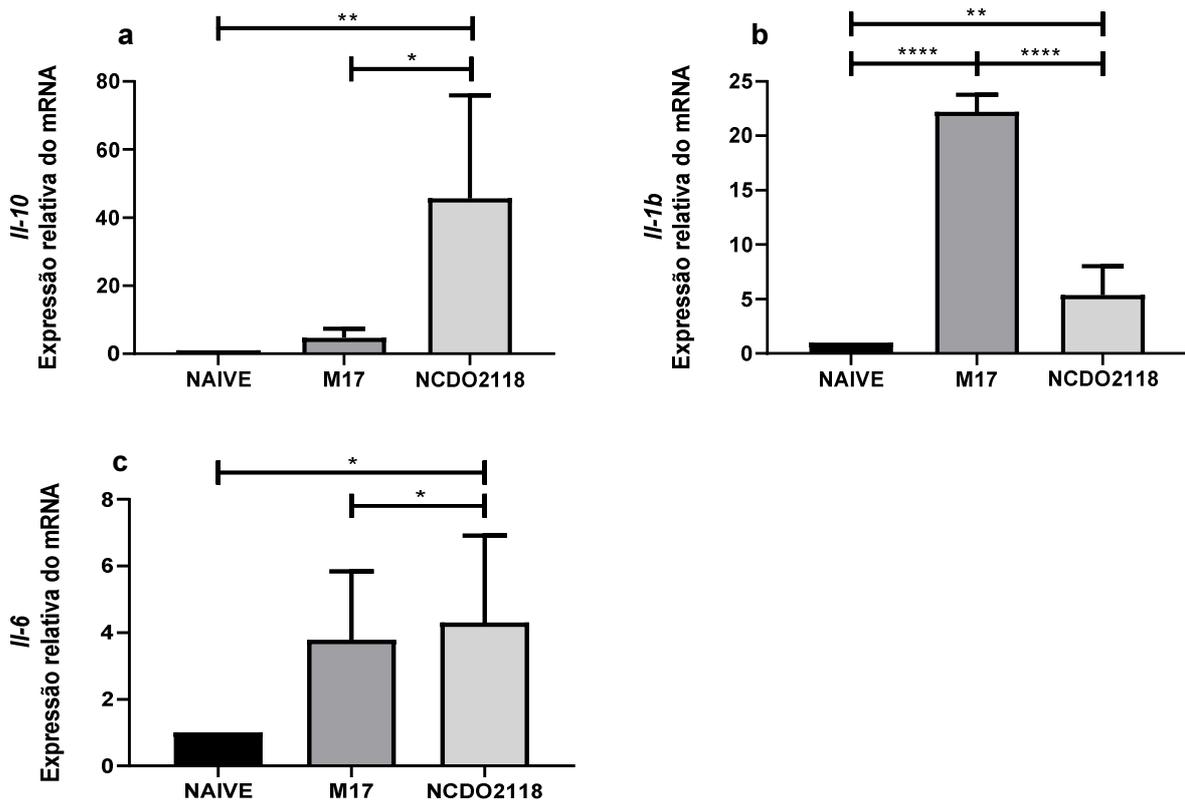


Figura 7: Expressão relativa do mRNA dos genes de citocinas relacionadas diretamente à resposta inflamatória, a) *Il-10*; b) *Il-1 β* ; c) *Il-6*, na mucosa do cólon de camundongos saudáveis tratados com meio M17, *Lactococcus lactis* NCDO2118 e água (Naive) durante vinte e um dias. Os níveis de expressão foram monitorados por RT-PCR. O teste one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey foram usados para as múltiplas comparações entre os grupos ($n=8$). Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e foram indicados da seguinte forma: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

5.3.1.3 Indicadores de Resposta Neurológica

5.3.1.3.1. *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ327

Com intuito de investigar a modulação dos indicadores de resposta neurológica após o consumo de CNRZ327, avaliamos por RT-qPCR os genes *Ido1*; *Thp1*; *Tdo2*; *GABAA1* e *GABAA2* (figura 8) vimos que houve um aumento significativo da expressão relativa de *Ido1* ($p < 0,01$), *GABAA1* ($p < 0,0001$), *GABAA2* ($p < 0,0001$) e *Tdo2* ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle, em *Thp1* não houve aumento da expressão. O grupo tratado apenas com meio de cultura apresentou aumento da expressão de *Ido1* ($p < 0,05$) para o controle, em *GABAA1*, *GABAA2* e *Tdo2* houve aumento da expressão, mas o grupo tratado com a cepa probiótica apresentou um aumento superior, ($p < 0,0001$; $p < 0,001$ e $p < 0,01$ respectivamente).

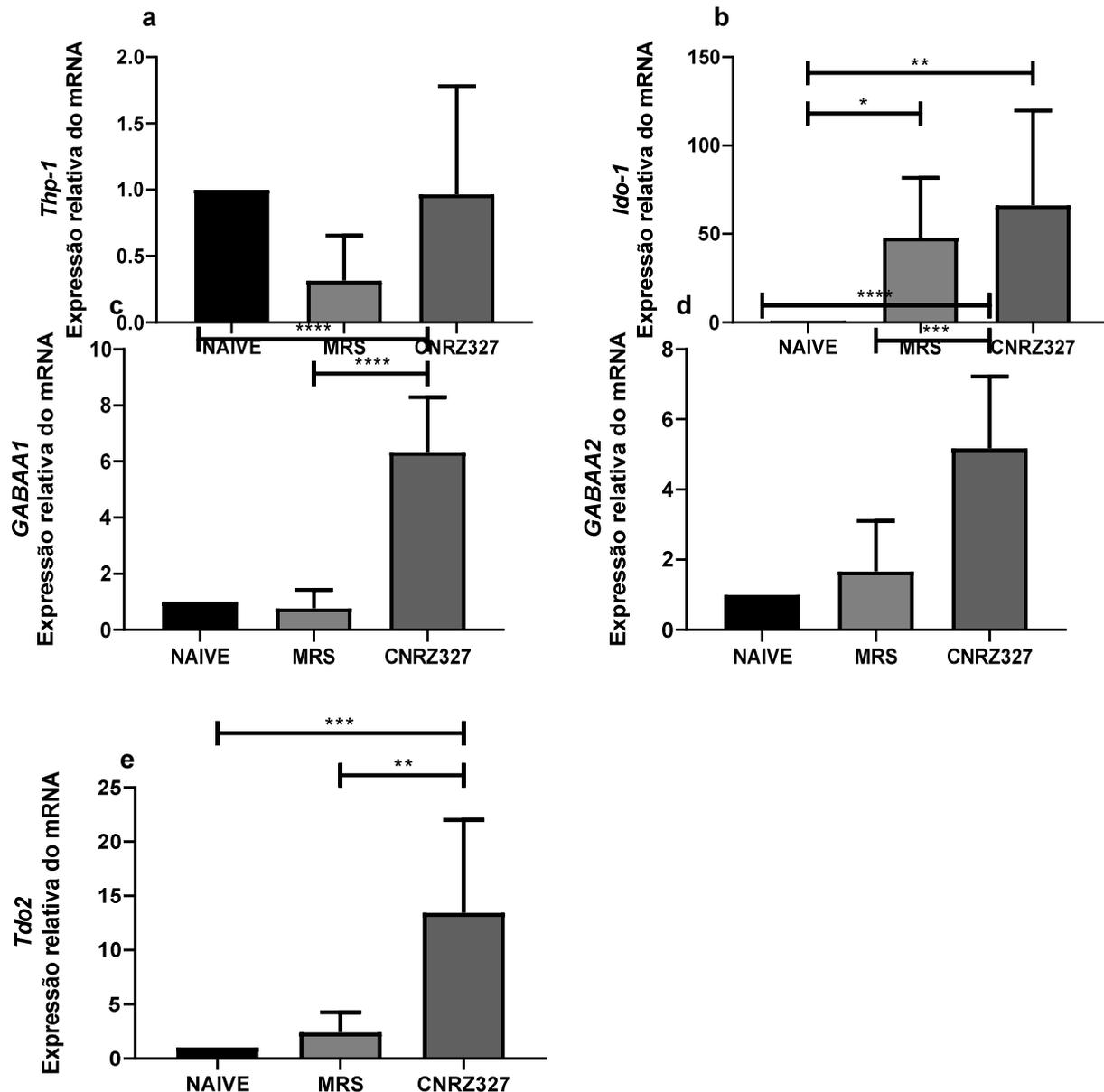
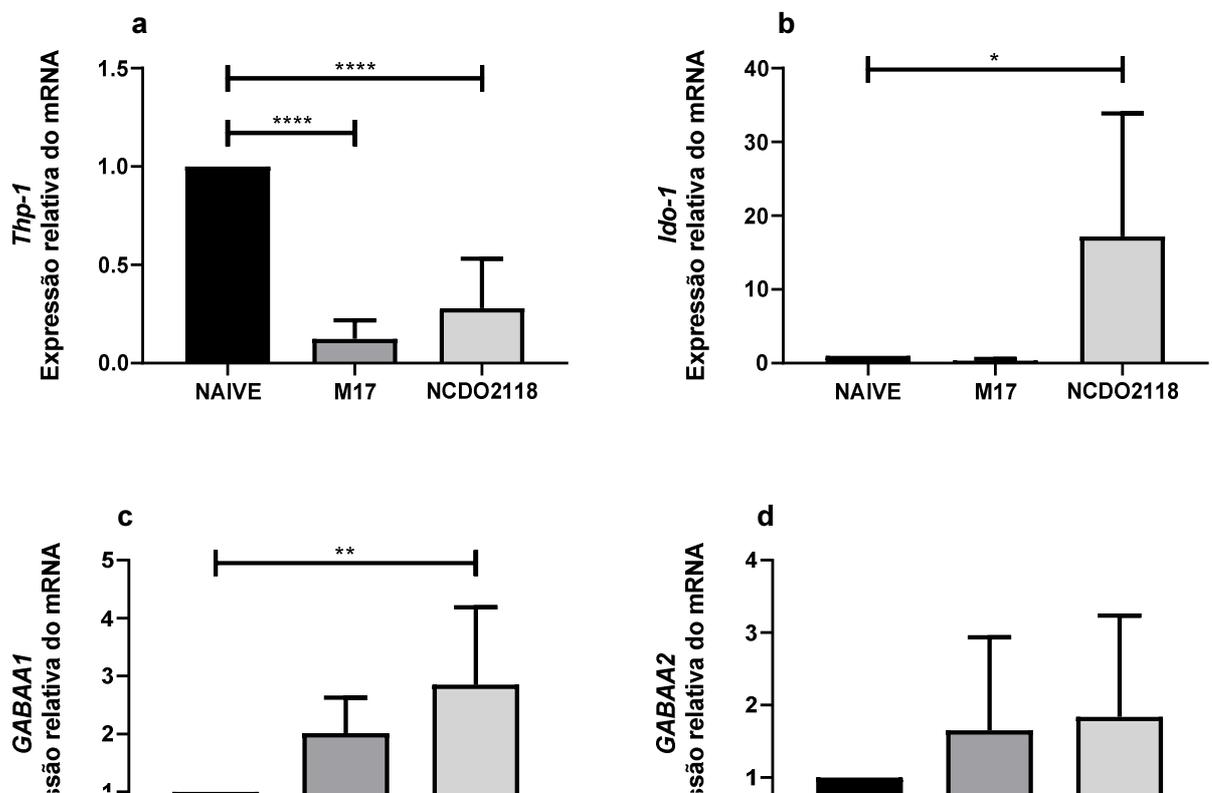


Figura 8: Expressão relativa do mRNA dos genes relacionados a resposta neurológica, a) *Thp 1*; b) *Ido 1*; c) *GABAA1*; d) *GABAA2*; d) *Tdo2*; na mucosa do cólon de camundongos saudáveis tratados com meio MRS, *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ327 e água (Naive) durante vinte e um dias. Os níveis de expressão foram monitorados por RT-PCR. O teste one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey foram usados para as múltiplas comparações entre os grupos (n=8). Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e foram indicados da seguinte forma: * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001 e **** p <0,0001.

5.3.1.3.2. *Lactococcus lactis* NCDO2118

Com intuito de investigar a modulação dos indicadores de resposta neurológica após o consumo de NCDO2118, avaliamos por RT-qPCR os genes *Ido1*; *Thp1*; *Tdo2*; *GABAA1* e *GABAA2* (figura 9) vimos que houve um aumento significativo da expressão de *Ido1* (p<0,05), *GABAA1* (p<0,01) e *Tdo2* (p<0,05). Em *GABAA2* o grupo tratado com o meio de cultura e o grupo tratado com a cepa probiótica apresentaram um leve aumento da expressão do gene e ambos os grupos reduziram significativamente a expressão de *Thp1* (p<0,0001).



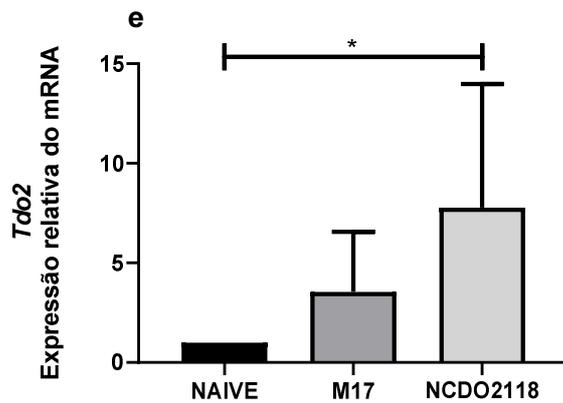
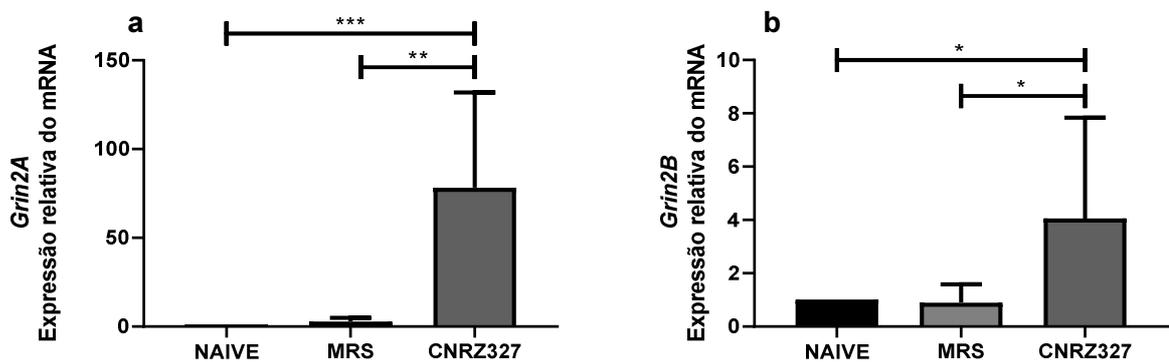


Figura 9: Expressão relativa do mRNA dos genes relacionados a resposta neurológica, a) *Thp 1*; b) *Ido 1*; c) *GABAA1*; d) *GABAA2*; d) *Tdo2*; na mucosa do cólon de camundongos saudáveis tratados com meio M17, *Lactococcus lactis* NCDO2118 e água (Naive) durante vinte e um dias. Os níveis de expressão foram monitorados por RT-PCR. O teste one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey foram usados para as múltiplas comparações entre os grupos (n=8). Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e foram indicados da seguinte forma: * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001 e **** p <0,0001.

Os níveis de expressão relativa dos indicadores de resposta neurológica *Grin2A*; *Grin2B*; *Ido1*; *Tdo2*; *Th*; *GABAA1* e *GABAA2* foram quantificados por RT-qPCR no Hipocampo (figura 10) vimos que a administração de CNRZ327 foi capaz de aumentar significativamente a expressão de *Grin2a* (p<0,001), *Grin2b* (p<0,05), *GABAA1* (p<0,05), *GABAA2* (p<0,01) e *Ido1* (p<0,001) em relação ao controle e a expressão de *Tdo2* e *Th* se manteve em valores próximos ao controle.



NA
2.5

NA
2.0

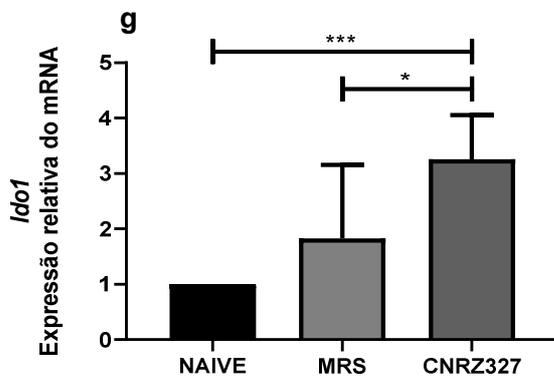


Figura 10: Expressão relativa do mRNA dos genes relacionados a resposta neurológica, a) Glutamate receptor, ionotropic, NMDA2A (epsilon 1); b) Glutamate receptor, ionotropic, NMDA2B (epsilon 2); c) Tryptophan 2,3-dioxygenase; d) Tyrosine hydroxylase; e) GABA receptor A α 1; f) GABA receptor A α 2; g) Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 no hipocampo de camundongos saudáveis tratados com meio MRS, *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ327 e água (Naive) durante vinte e um dias. Os níveis de expressão foram monitorados por RT-PCR. O teste one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey foram usados para as múltiplas comparações entre os grupos (n=8). Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e foram

indicados da seguinte forma: * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001 e **** p <0,0001.

5.3.1.3 *Lactococcus lactis* NCDO2118

Os níveis de expressão relativa dos indicadores de resposta neurológica *Grin2A*; *Grin2B*; *Ido1*; *Tdo2*; *Th*; *GABAA1* e *GABAA2* foram quantificados por RT-qPCR no Hipocampo (figura 11) vimos que a administração de NCDO2118 aumentou significativamente a expressão de *Grin2a* ($p < 0,0001$), *Grin2b* ($p < 0,01$), *Tdo2* ($p < 0,01$), *GABAA2* ($p < 0,01$) e *Ido1* ($p < 0,001$) comparando com o grupo controle, vimos também que houve queda na expressão de *Th* ($p < 0,05$) e um leve aumento da expressão de *GABAA1*, mas o grupo tratado com meio de cultura teve um maior aumento da expressão ($p < 0,001$).

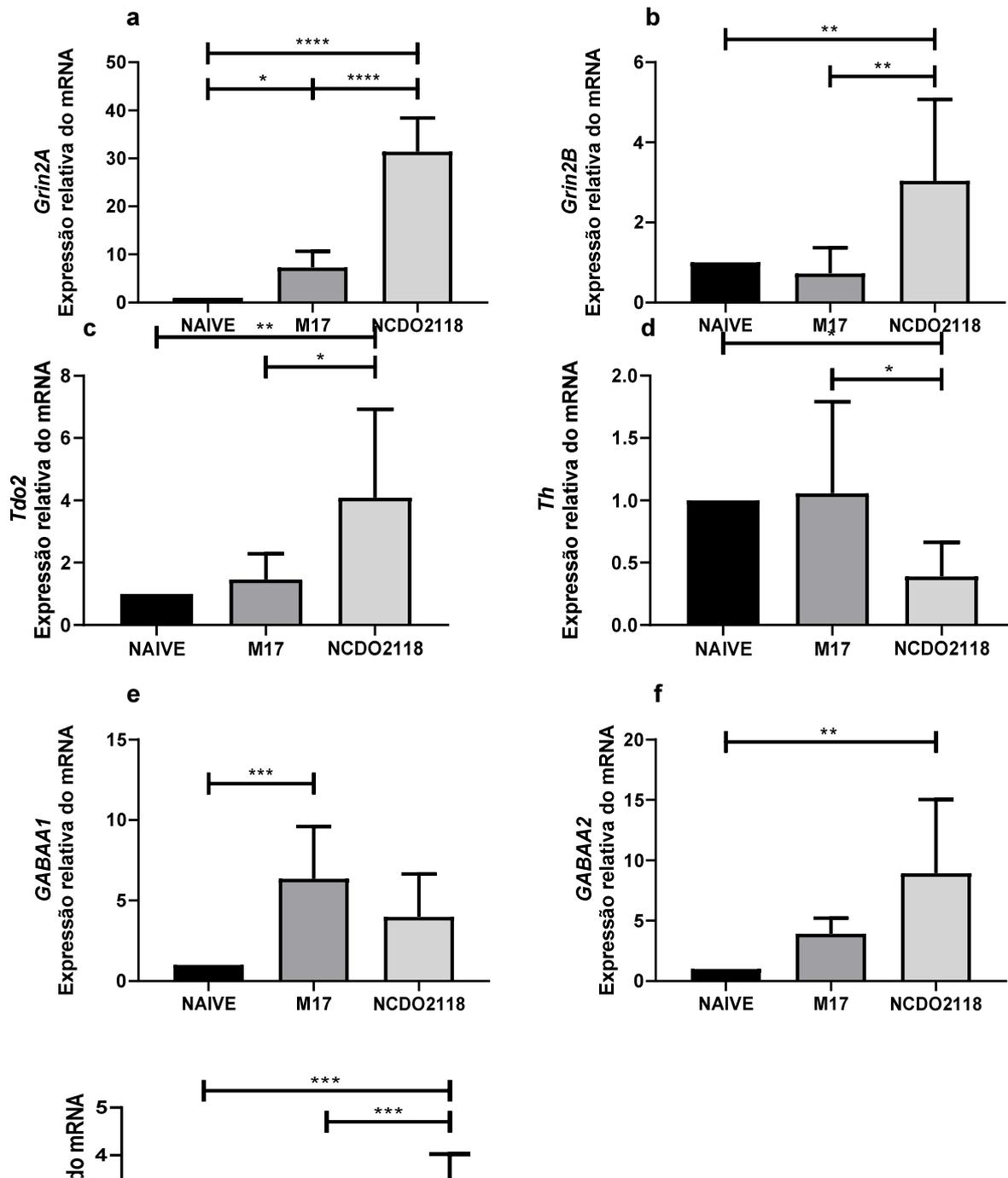


Figura 11: Expressão relativa do mRNA dos genes relacionados a resposta neurológica, a) *Grin2a* b) *Grin2b* c) *Tdo2*; d) *Th*; e) *GABAA1*; f) *GABAA2*; g) *Ido 1* no hipocampo de camundongos saudáveis tratados com meio M17, *Lactococcus lactis* NCDO2118 e água (Naive) durante vinte e um dias. Os níveis de expressão foram monitorados por RT-PCR. O teste one-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey foram usados para as múltiplas comparações entre os grupos (n=8). Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e foram indicados da seguinte forma: * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001 e **** p <0,0001.

6. DISCUSSÃO

O intestino e o cérebro podem se comunicar por vias neurais e humorais através do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), que é um dos maiores sistemas neuroendócrino, associado ao controle do estresse, regulação do sistema imune, humor e emoções. Uma desregulação neste sistema pode levar a quadros depressivos e de ansiedade. A microbiota é capaz de influenciar o eixo HPA e modular respostas imunes, através de seus metabólitos e, conseqüentemente podem ser associados com quadros psicopatológicos. Dessa forma, a ingestão de bactérias específicas podem modular a microbiota e conseqüentemente promulgar efeitos no eixo intestino-cérebro. Uma variedade de linhagens probióticas, como algumas espécies de Bactérias Láticas (BL), apresentaram efeitos anti-inflamatórios comprovados, além disso têm sido estudadas a capacidade de BL em amenizar os sintomas de distúrbios psicológicos. Dentre as várias espécies de BL, destaca-se as linhagens de

Lactobacillus que são capazes de produzir neurotransmissores, por exemplo, o ácido-gama-aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central. De forma interessante, os efeitos promulgados pelo GABA são mediados por receptores que comumente são alvos de fármacos ansiolíticos. Estudos mostram que bactérias probióticas podem modular a resposta ao estresse e melhorar os sintomas de humor e ansiedade. Neste trabalho pretendemos avaliar o efeito probiótico e potencial psicobiótico de linhagens probióticas produtoras de GABA em camundongos saudáveis (BRAVO *et al.*, 2011).

A determinação das seções que foram trabalhadas infere em como estas contribuem para a homeostase do organismo. O cólon abriga a maior porção da microbiota, isto se deve graças à predominância anaeróbica do tecido, desta forma o cólon se torna o microambiente perfeito para a microbiota, uma vez que há predominância de microrganismos anaeróbios em sua composição (CREMER; ARNOLDINI; HWA, 2017) No Hipocampo os efeitos serotoninérgicos atuam na modulação dos efeitos comportamentais. Diversas drogas atuam em alterações plásticas, na neurogênese e aumentam a expressão de fatores neurotróficos (ANAND; DHIKAV, 2012)

Buscamos então avaliar como ocorre a modulação do eixo intestino cérebro por meio da expressão relativa de genes diretamente conectados ao sistema após vinte e um dias de administração de duas diferentes cepas probióticas. Inicialmente, nos resultados mostraram que tanto *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ327 e *Lactococcus lactis* NCDO2118, dentre as cepas estudadas, mostram maior produção de GABA em comparação com as demais cepas testadas, 0,3925 g/L e 0,4203 g/L respectivamente. A atividade dos receptores de GABA no organismo é de grande importância no estudo do eixo visto que é o neurotransmissor inibitório mais importante do SNC, este também atua diretamente no comportamento, como por exemplo regulação da agressividade e controle do estresse (BAK; SCHOUSBOE; WAAGEPETERSEN, 2006). Oliveira e colaboradores (2014) determinou a partir do sequenciamento do genoma que a linhagem probiótica *Lactococcus lactis* NCDO2118 possui a capacidade de sintetizar GABA, o mesmo foi realizado por Santos-Rocha e colaboradores para a cepa probiótica *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ 327(Santos-Rocha 2014), desta forma ambas as linhagens apresentam os genes responsáveis para sintetizar GABA a partir de glutamato.

Considerando os resultados encontrados anteriormente, decidimos avaliar se o consumo dessas cepas produtoras de GABA durante um longo período (21 dias) pode afetar a

modulação de genes implicados no eixo. Inicialmente avaliamos a progressão do peso dos animais durante o período experimental, conforme os estudos de (CORDEIRO *et al.*, 2018; DARBY *et al.*, 2019) a administração de cepas probióticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Lactococcus* são capazes de impedir a perda de peso em modelo murino, nossos resultados mostraram que ambas as cepas probióticas foram capazes de impedir a perda de peso nos animais ao longo dos vinte e um dias de tratamento, os grupos que foram tratados apenas com o meio de cultura apresentaram peso relativamente menor que o grupo controle, mas a progressão se manteve linear durante o período experimental, desta forma podemos deduzir que ambas as cepas probióticas possuem a capacidade de impedir a perda de peso e manter homogênea a progressão do peso dos animais.

Após avaliação da perda de peso dos animais, iniciamos as análises dos dados obtidos na RT-qPCR. No cólon investigamos inicialmente a capacidade da modulação da barreira epitelial. Diversos estudos mostram que a administração de probióticos induz o aumento da expressão de genes relacionados à estrutura e integridade do epitélio (ZHANG *et al.*, 2018). Desta forma investigamos a transcrição dos genes relacionados à proteínas responsáveis pela formação e a manutenção da integridade da barreira epitelial como *Ocln*, proteína de membrana integral que é necessária para a regulação induzida por citocinas de barreira de permeabilidade paracelular de zonas de oclusão e *Cld-1* um membro da família das claudinas, é uma proteína integral da membrana e um componente das cadeias de junção. Ao avaliar nossos resultados vimos que a expressão relativa de *Ocln* foi consideravelmente aumentada quando comparados com os controles, enquanto a expressão de *Cld1* se manteve em níveis próximos ao controle, houve também um aumento da expressão das proteínas *tight junctions* 1 e 2, *Tjp1* é uma proteína adaptadora de zonas de oclusão que também regula as junções aderentes, enquanto *Tjp2* é um componente da barreira de zona de oclusão nas células epiteliais e endoteliais, necessária para a montagem adequada das zonas de oclusão. Este aumento sugere que os animais tratados podem ser capazes de reduzir a permeabilidade intestinal, o que permite que a mucosa intestinal impeça a entrada e adesão de microrganismos patológicos ou impedir a entrada de substâncias tóxicas para o tecido. (HUNG; SUZUKI, 2018; LA FATA; WEBER; MOHAJERI, 2018; PEARCE *et al.*, 2018; ZAKOSTELSKA *et al.*, 2011). Por fim avaliamos a expressão de *Muc2*, este é responsável pela síntese de mucina, principal responsável pela formação da camada de muco no epitélio intestinal, este por sua vez é responsável pela lubrificação e proteção do tecido por meio de sinalização celular e formação de barreira química (MARTÍN *et al.*, 2017), obtivemos um

aumento da expressão de *Muc2* em ambos os grupos tratados com as cepas probióticas o que sugere possível aumento da produção de muco no epitélio intestinal.

Todos os dados obtidos corroboram que a administração de CNRZ327 e NCDO2118 proporcionou aos animais um aumento da expressão gênica dos componentes da barreira epitelial, as zonas de oclusão e camada de muco aumentadas podem fornecer uma proteção integral em processos inflamatórios, ademais com a estabilidade da barreira epitelial os marcadores relacionados a comunicação do sistema imune da mucosa com o eixo HPA podem obter uma resposta mais eficiente para a ativação das vias neurológicas que atuam diretamente no intestino (LA FATA; WEBER; MOHAJERI, 2018; MARTIN *et al.*, 2018).

Com a confirmação do aumento da expressão dos genes relacionados a integridade da barreira epitelial, buscamos avaliar os indicadores de resposta inflamatória, de acordo com DINAN e colaboradores (2017), aumentos locais e sistêmicos de *Il-6* e *Il-1 β* provocam a ativação do eixo HPA induzindo a resposta do sistema nervoso central diretamente no TGI. Em nossos resultados vimos um aumento da expressão de ambas as citocinas, o grupo que foi tratado com meio de cultura M17 teve um aumento substancial da expressão de *Il1 β* o que sugere que ele é capaz de estimular o aumento da transcrição, o grupo tratado com meio MRS teve a expressão de *Il-1 β* aumentada, mas inferior ao grupo tratado com a bactéria e neste caso sugere que CNRZ327 é capaz de aumentar a expressão de *Il-6* e *Il-1 β* . Outra citocina avaliada foi *Il-10* a qual é a principal citocina anti-inflamatória do organismo, esta é considerada um inibidor chave de inflamação e imunidade mediada por células dependentes de *Th1*, especialmente inibindo a produção de *Il-1 β* , *TNF* e *Il-6* (HOP *et al.*, 2018). Naturalmente o organismo exibe níveis de secreção e circulação de citocinas tanto pró quanto anti-inflamatórias para que haja homeostase e níveis de apresentação de antígenos, desta forma o aumento da expressão das *Il-6* e *Il-1 β* pode induzir o aumento da expressão de *Il-10*, uma vez que esta pode agir inibindo as demais citocinas no organismo em caso de excesso de produção ou atividade ajudando assim a manter a homeostase (FEMIA *et al.*, 2012; JEON *et al.*, 2012; WASILEWSKA; ZLOTKOWSKA; WROBLEWSKA, 2019; ZHENG *et al.*, 2017).

Com a confirmação do aumento da expressão de *Il-6* e *Il-1 β* cresce a possibilidade da ativação dos mecanismos de comunicação do eixo intestino-cérebro para isto investigamos alguns dos indicadores desta via tanto na mucosa do cólon quanto do

hipocampo. Diversos neurotransmissores participam da regulação do comportamento seja com ação excitatória, inibitória ou regulação emocional. A Serotonina é um dos principais hormônios e possui ampla atividade nestas funções, ela atua diretamente na motilidade intestinal além de regular o sono, humor, cognição entre outras funções (CARHART-HARRIS; NUTT, 2017). A serotonina é catalisada pela hidroxilase triptofano (*Tph1*), investigamos sua expressão na mucosa do cólon e vimos que a administração de CNRZ327 exibiu níveis próximos ao grupo controle enquanto o grupo tratado com NCDO2118 teve expressão abaixo do grupo controle. Estes níveis de expressão sugerem que pode haver um limiar da transcrição deste gene, uma vez confirmada a possível homeostase por meio da integridade da barreira epitelial e resposta inflamatória podemos sugerir que os níveis de serotonina estão regulares não necessitando que haja aumento da catálise de triptofano (MAO *et al.*, 2019; MHATRE V. HO AND KELSEY C. MARTIN, 2012; REIGSTAD *et al.*, 2015).

Além da serotonina, a nicotinamida precursora de NAD, sintetizada do triptofano pela via da quinurenina, também representa grande importância no estudo do eixo intestino-cérebro e neuropatologias segundo BLANKFIELD, (2013) baixos índices de nicotinamida no organismo podem levar a diversos distúrbios, desde a desregulação inflamatória em tecidos periféricos até alterações neurológicas. Desta forma avaliamos a expressão relativa de *Ido1* e *Tdo2*, na mucosa do cólon e no hipocampo. *Ido1* é responsável pela primeira e limitante taxa no catabolismo do triptofano para N-formil-quinurenina, *Tdo2* atua no metabolismo do triptofano e é responsável pelo primeiro e limitante passo na via da quinurenina. No cólon vimos que a administração de ambas as cepas probióticas foram capazes de aumentar a expressão de ambos os genes, no hipocampo as bactérias também foram capazes de induzir aumento da expressão de *Ido1*, os níveis de expressão de *Tdo2* no grupo tratado com CNRZ327 se manteve semelhante ao grupo controle e NCDO2118 foi capaz de aumentar a expressão do gene, uma vez que ambos os genes influenciam diretamente na fase inicial da via da quinurenina podemos afirmar a partir de nossos resultados que há uma indicação de níveis suficientes de nicotinamida sendo produzidos por estes animais o que sugere possível homeostase no eixo e potencialmente maior proteção neurológica (CAMARILLO *et al.*, 2020; LOU *et al.*, 2019; MUKHERJEE *et al.*, 2019; MUTZ *et al.*, 2016; NIKOLAUS *et al.*, 2017).

No hipocampo também avaliamos a expressão de *Th*, este é responsável pela conversão de tirosina em dopamina, hormônio que atua na regulação do sono, prazer,

aprendizagem entre outras funções, assim como a serotonina e a nicotinamida, a dopamina exerce uma grande influência da manutenção da sinapse neuronal (GOZAL *et al.*, 2005; JEONG *et al.*, 2006; TANK *et al.*, 2008). Desta forma buscamos avaliar o perfil de expressão relativa deste gene no hipocampo de nossos animais, vimos então que a administração de ambas as cepas probióticas não foram capazes de induzir o aumento da expressão, isto sugere que podem haver dois diferentes cenários, o primeiro a administração das bactérias não é capaz de modular a produção de *Th*, o segundo cenário há um limiar de produção onde o organismo em homeostase limita a transcrição do gene.

Uma vez estabelecidas as evidências do aumento da expressão gênica de diversos indicadores que podem ser afetados por alterações na mucosa intestinal, investigamos a expressão de *Grin2a* e *Grin2b*, estes são duas subunidades dos canais iônicos dos receptores *N*-metil-d-aspartato (NMDAR). O NMDAR está relacionado ao aprendizado espacial e memória no hipocampo, além da indução da plasticidade sináptica a longo prazo. Há relatos que distúrbios nos receptores NMDAR estão associados à alterações nas funções cognitivas associadas ao envelhecimento, isquemia cerebral, depressão e esquizofrenia, assim como há também relatos de que o aumento da expressão de *Grin2b* induz desenvolvimento superior à aprendizagem e memória (KARISSETTY *et al.*, 2017; LUCIA *et al.*, 2019; YAWALKAR; CHANGOTRA; GUPTA, 2018). Nossos resultados mostraram um aumento significativo na expressão de ambos os genes após a administração de ambas as cepas probióticas, este aumento pode indicar que exista uma possível interação entre a microbiota e os processos de aprendizagem e memória e ambas as bactérias foram capazes de regular a via de produção do NMDAR possibilitando assim um aumento progressivo nestes processos (KARISSETTY *et al.*, 2017).

Finalmente, como uma última avaliação dos indicadores de resposta neurológica avaliamos a produção dos receptores de GABA_A subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 2$, a mediação da atividade de GABA no organismo ocorre por meio de seus receptores, comumente a composição desses receptores inclui as subunidades $A\alpha 1$ e $A\alpha 2$, porém há indícios de atividade de até dezenove subunidades na formação de receptores, o GABA está diretamente associado ao comportamento de agressividade, estresse e distresse, atuando na inibição das vias responsáveis por tais efeitos no organismo, desta forma investigamos a expressão destas subunidades tanto na mucosa do cólon quanto no hipocampo. A administração de CNRZ327 e NCCDO2118 foi capaz de aumentar significativamente a expressão de ambos os receptores no cólon, desta forma é possível afirmar que a atividade

de GABA no cólon destes animais está potencialmente aumentada apesar desta evidência não é possível afirmar qual o real efeito líquido que esta alteração traz para os animais, uma vez que é necessária a avaliação da atividade do neurotransmissor por outras técnicas, como o proteoma, e a investigação genômica da microbiota, desta forma será possível identificarmos qual a real relação entre o consumo destas cepas probióticas e a atividade tanto dos receptores de GABA quanto do próprio neurotransmissor (AUTERI; ZIZZO; SERIO, 2015; SEIFI *et al.*, 2014), no hipocampo (FATEMI *et al.*, 2013; OYARZABAL *et al.*, 2020; PLATT; ZWARTJES; BRISTOW, 1996) vimos que ambas as cepas probióticas foram capazes de aumentar a expressão dos receptores, mas em $\alpha 1$ houve um aumento da expressão um pouco maior nos grupos tratados com ambos os meios de cultura, isto pode ocorrer devido à população residente de bactérias na microbiota, estes meios são designados para o crescimento específico dos gêneros *Lactobacillus* e *Lactococcus*, e podem naturalmente estimular o crescimento de microrganismos pertencentes à estes gêneros na microbiota. O aumento das subunidades dos receptores de GABA sugere que há atuação do neurotransmissor no hipocampo bem como no cólon.

Diversos resultados foram obtidos neste estudo o que nos leva a acreditar que a administração a longo prazo de CNRZ327 e NCDO2118 é capaz de modular ativamente o eixo intestino-cérebro, com isto abrimos um precedente para futuras investigações do papel destes microrganismos em cada uma das vias com maior clareza, o estudo da proteoma destes animais nos permitirá analisar a produção de todas as proteínas relacionadas ao eixo, além do microbioma poder esclarecer diversos questionamentos, tais como o papel do meio de cultura na microbiota residente e em como isto pode influenciar na síntese dos indicadores ligados à comunicação intestino-cérebro.

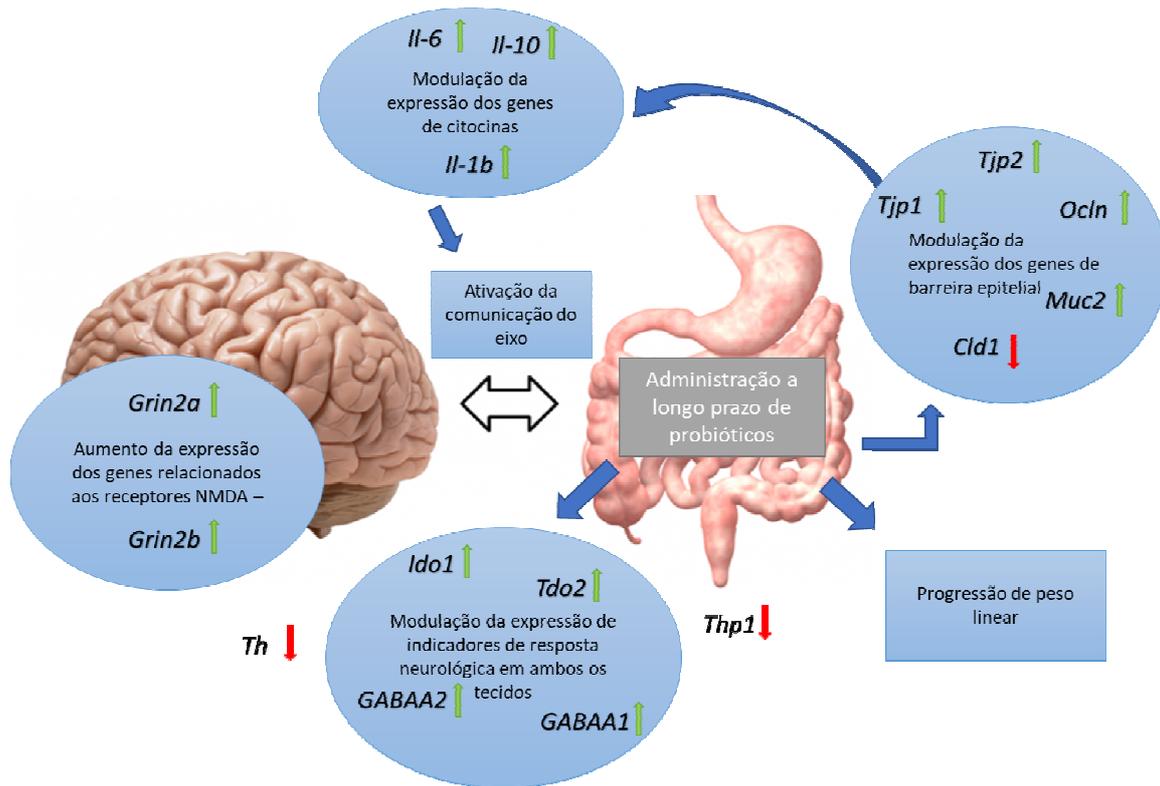


Figura 12: Fluxograma da modulação das cepas probióticas a longo prazo: a administração de CNRZ327 e NCDO2118 foi capaz de modular a expressão relativa dos genes relacionados à barreira epitelial, indicadores de resposta inflamatória e indicadores de resposta neurológica. Setas verdes representam os genes em que a expressão foi aumentada e setas vermelhas representam os genes em que a expressão foi diminuída.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que as linhagens *Lactococcus lactis* NCDO2118 e *Lactobacillus delbrueckii* CNRZ327, que tiveram uma maior produção de GABA, modularam os receptores GABA A α 1 e 2 responsáveis pela mediação dos efeitos do GABA, além do aumento da expressão de *Ido1* e *Tdo2* que são moléculas com papel no metabolismo de triptofano, e das subunidades do canal iônico do receptor NMDA, *Grin2a* e *Grin2b* o qual atuam como local de ligação agonista para o glutamato, no eixo intestino-cérebro. Além disso, o consumo de ambas as cepas aumentou a expressão relativa dos genes ligados à barreira epitelial (*Tjp1*, *Tjp2*, *Muc2*, *Ocln*) o que sugere um possível aumento do potencial de reparação do epitélio intestinal.

Outro importante resultado que obtivemos foi o aumento da expressão de *IL-10* nos animais tratados com as duas linhagens, essa citocina tem efeitos anti-inflamatórios e supressivos na maioria das células hematopoiéticas e indiretamente possui a capacidade de suprimir a produção de outras citocinas, mas também foi observado aumento significativo na produção de *IL-6* e *IL-1 β* estas participam das via de sinalização para ativação do eixo HPA. Ao avaliar os resultados relacionados aos genes de resposta neurológica podemos ver também um aumento da expressão dos receptores de GABA tanto no hipocampo quanto no cólon o que indica que há comunicação no eixo e conseqüentemente o possível aumento da atividade inibitória proporcionada pela atividade do GABA no organismo.

Diversos resultados interessantes foram obtidos neste trabalho, o que abre novas perspectivas para a investigação do papel destas cepas probióticas no eixo. A avaliação das vias da serotonina e das catecolaminas em sua totalidade é uma importante ferramenta para a investigação de alterações provocadas no organismo pela administração a longo prazo de probióticos. Outra importante ferramenta do eixo a ser avaliada são as subunidades formadoras dos receptores de GABA, sabe-se que há 19 subunidades que participam na formação do receptor *GABA_{A/C}*, além do receptor *GABA_B*.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar análise proteômica intestinal de camundongos tratados por espectrometria de massa (shotgun);
- Análise da microbiota intestinal da amostra fecal de camundongos tratados por sequenciamento de terceira geração (shotgun).
- Aplicar o protocolo de tratamento a um modelo murino de ansiedade e depressão.
- Investigar a via de síntese de 5-HT em todos os seus componentes por meio de RT-qPCR
- Investigar a via das catecolaminas (dopamina, epinefrina e norepinefrina) em todos os seus componentes por meio de RT-qPCR
- Investigar as demais subunidades dos receptores de GABA por meio de RT-qPCR

9. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigos científicos aceitos e publicados:

1. CORDEIRO, BÁRBARA F. ; LEMOS, LUISA ; **OLIVEIRA, EMILIANO R.** ; SILVA, SARA H. ; SAVASSI, BRUNA ; FIGUEIROA, ALESSANDRA ; FARIA, ANA MARIA C. ; FERREIRA, ENIO ; ESMERINO, ERICK A. ; ROCHA, RAMON S. ; FREITAS, MÔNICA Q. ; SILVA, MARCIA C. ; CRUZ, ADRIANO G. ; CARMO, FILLIPE LUIZ R. ; AZEVEDO, VASCO . Prato cheese containing Lactobacillus casei 01 fails to prevent dextran sodium sulphate-induced colitis. INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL **JCR**, v. 99, p. 104551, 2019.
2. CORDEIRO, BÁRBARA F. ; **OLIVEIRA, EMILIANO R.** ; DA SILVA, SARA H. ; SAVASSI, BRUNA M. ; ACURCIO, LEONARDO B. ; LEMOS, LUISA ; ALVES, JULIANA DE L. ; CARVALHO ASSIS, HELDER ; VIEIRA, ANGÉLICA T. ; FARIA, ANA M. C. ; FERREIRA, ENIO ; LE LOIR, YVES ; JAN, GWÉNAËL ; GOULART, LUIZ R. ; AZEVEDO, VASCO ; CARVALHO, RODRIGO D. DE O. ; DO CARMO, FILLIPE L. R. . Whey Protein Isolate-Supplemented Beverage, Fermented by Lactobacillus casei BL23 and Propionibacterium freudenreichii 138, in the Prevention of Mucositis in Mice. Frontiers in Microbiology **JCR**, v. 9, p. 2035, 2018.
3. DO CARMO, FILLIPE L. R. ; SILVA, WANDERSON M. ; TAVARES, GUILHERME C. ; IBRAIM, IZABELA C. ; CORDEIRO, BARBARA F. ; **OLIVEIRA, EMILIANO R.** ; RABAH, HOUEM ; CAUTY, CHANTAL ; DA SILVA, SARA H. ; CANÁRIO VIANA, MARCUS V. ; CAETANO, ANA C. B. ; DOS SANTOS, ROSELANE G. ; DE OLIVEIRA CARVALHO, RODRIGO D. ; JARDIN, JULIEN ; PEREIRA, FELIPE L. ; FOLADOR, EDSON L. ; LE LOIR, YVES ; FIGUEIREDO, HENRIQUE C. P. ; JAN, GWÉNAËL ; AZEVEDO, VASCO . Mutation of the Surface Layer Protein SlpB Has Pleiotropic Effects in the Probiotic Propionibacterium freudenreichii CIRM-BIA 129. Frontiers in Microbiology **JCR**, v. 9, p. 1807, 2018.
4. DO CARMO, FILLIPE LUIZ ROSA ; RABAH, HOUEM ; CORDEIRO, BARBARA FERNANDES ; SILVA, SARA HELOISA DA ; PESSOA, RAFAELA MIRANDA ; FERNANDES, SIMONE ODÍLIA ANTUNES ; CARDOSO, VALBERT NASCIMENTO ; GAGNAIRE, VALÉRIE ; DEPLANCHE, MARTINE ; SAVASSI, BRUNA ; FIGUEIROA, ALESSANDRA ; **OLIVEIRA, EMILIANO ROSA** ; FONSECA, CAIO CÉSAR ; QUEIROZ, MARIA IZABEL ALVES ; RODRIGUES, NÚBIA MORAIS ; SANDES, SÁVIO HENRIQUE DE CICCIO ; NUNES, ÁLVARO CANTINI ; LEMOS, LUISA ; ALVES, JULIANA DE LIMA ; FARIA, ANA MARIA CAETANO ; FERREIRA, ÊNIO ; LE LOIR, YVES ; JAN, GWÉNAËL ; AZEVEDO, VASCO .

Probiotic *Propionibacterium freudenreichii* requires SlpB protein to mitigate mucositis induced by chemotherapy. *Oncotarget JCR*, v. 10, p. 7198-7219, 2019.

5. RABAH, HOUEM ; DO CARMO, FILLIPE LUIZ ROSA ; CARVALHO, RODRIGO DIAS DE OLIVEIRA ; CORDEIRO, BARBARA FERNANDES ; DA SILVA, SARA HELOISA ; **OLIVEIRA, EMILIANO ROSA** ; LEMOS, LUISA ; CARA, DENISE CARMONA ; FARIA, ANA MARIA CAETANO ; GARRIC, GILLES ; HAREL-OGER, MARIELLE ; LE LOIR, YVES ; AZEVEDO, VASCO ; BOUGUEN, GUILLAUME ; JAN, GWÉNAËL . Beneficial Propionibacteria within a Probiotic Emmental Cheese: Impact on Dextran Sodium Sulphate-Induced Colitis in Mice. *Microorganisms JCR*, v. 8, p. 380, 2020.

Artigos submetidos para publicação:

1. **Therapeutic effects of probiotic Minas Frescal cheese on the attenuation of ulcerative colitis in a murine model**
Bárbara F. Cordeiro, Juliana L. Alves, Giovanna A. Belo, **Emiliano R. Oliveira**, Marina P. Braga, Sara H. da Silva, Luisa Lemos, Jonas T. Guimarães, Ramon Silva, Ramon S. Rocha, Gwénaël Jan, Marcia Cristina Silva, Mônica Q. Freitas, Erick A. Esmerino, Alfonso Gala-García, Enio Ferreira, Ana Maria C. Faria, Adriano G. Cruz, Vasco Azevedo and Fillipe L. R do Carmo.

Patentes depositadas:

1. AZEVEDO, VASCO ; DO CARMO, FILLIPE L. R. ; CORDEIRO, B. F. ; CARVALHO, R. D. O. ; SAVASSI, B. M. ; **OLIVEIRA, E. R.** ; SILVA, S. H. . Composição Para Tratamento Ou Prevenção Da Mucosite E Uso. 2019, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020190056142, título: "Composição Para Tratamento Ou Prevenção Da Mucosite E Uso" , Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 22/03/2019

Mesas Redondas:

1. **OLIVEIRA, E. R.**. Ciências da Saúde. 2019. Mesa redonda da semana do Biólogo – Faculdade Pitágoras de Belo Horizonte.

Cursos ministrados:

1. **OLIVEIRA, E. R.** Microrganismos Probióticos: Diversidade e aplicabilidade em doenças inflamatórias intestinais. 2018. Curso de curta duração – Semana do Biólogo – Faculdade Pitágoras de Belo Horizonte.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANAND, Kuljeet; DHIKAV, Vikas. Hippocampus in health and disease: An overview. *Annals of Indian Academy of Neurology*, v. 15, n. 4, p. 239–246, 2012.
- ANITHA, Mallappa *et al.* Gut microbial products regulate murine gastrointestinal motility via toll-like receptor 4 signaling. *Gastroenterology*, v. 143, n. 4, p. 1006–1016, 2012.
- ASHRAF, Rabia; SHAH, Nagendra P. Immune System Stimulation by Probiotic Microorganisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 54, n. 7, p. 938–956, 2014.
- A. MELNICK L. SHENG, M Christopher. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Physiology & behavior*, v. 176, n. 1, p. 100–106, 2016.
- ALLAIRE, Joannie M. *et al.* The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends in Immunology*, v. 39, n. 9, p. 677–696, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.it.2018.04.002>>.
- ATARASHI, Koji *et al.* Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science*, v. 331, n. 6015, p. 337–341, 2011. Disponível em: <<http://stke.sciencemag.org/cgi/content/abstract/sci;331/6015/337>>.
- AUTERI, Michelangelo; ZIZZO, Maria Grazia; SERIO, Rosa. GABA and GABA receptors in the gastrointestinal tract: From motility to inflammation. *Pharmacological Research*, v. 93, p. 11–21, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2014.12.001>>.
- BAK, Lasse K.; SCHOUSBOE, Arne; WAAGEPETERSEN, Helle S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: Aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of Neurochemistry*, v. 98, n. 3, p. 641–653, 2006.
- BERMUDEZ-BRITO, Miriam *et al.* Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*. [S.l: s.n.], 2012
- BLANKFIELD, Adele. Kynurenine pathway pathologies: Do nicotinamide and other pathway

co-factors have a therapeutic role in reduction of symptom severity, including chronic fatigue syndrome (CFS) and fibromyalgia (FM). *International Journal of Tryptophan Research*, v. 6, n. SUPPL.1, p. 39–45, 2013.

BLISS, Edward S.; WHITESIDE, Eliza. The gut-brain axis, the human gut microbiota and their integration in the development of obesity. *Frontiers in Physiology*, v. 9, n. JUL, 2018.

BRANDÃO, Rogelio L. *et al.* Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 2, p. 564–568, 1998.

BRAVO, Javier A. *et al.* Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 38, p. 16050–16055, 2011.

BROWN, Amy C. *et al.* A non-dairy probiotic's (poi) influence on changing the gastrointestinal tract's microflora environment. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, v. 11, n. 1, p. 58–64, 2005.

CAMARILLO, Gabriela Fonseca *et al.* Gene expression profiling of mediators associated with the inflammatory pathways in the intestinal tissue from patients with ulcerative colitis. *Mediators of Inflammation*, v. 2020, 2020.

CARABOTTI, Marilia *et al.* The gut-brain axis: Interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Annals of Gastroenterology*, v. 28, n. 2, p. 203–209, 2015.

CARHART-HARRIS, R. L.; NUTT, D. J. Serotonin and brain function: A tale of two receptors. *Journal of Psychopharmacology*, v. 31, n. 9, p. 1091–1120, 2017.

CHEN, Kesen *et al.* Study on the Method for Evaluating Ecological Health of the Main River Network in the Yellow River's Estuary Area. 2013, London: Springer London, 2013. p. 941–948.

CLEUSIX, Valentine *et al.* Glycerol induces reuterin production and decreases *Escherichia coli* population in an in vitro model of colonic fermentation with immobilized human feces.

FEMS Microbiology Ecology, v. 63, n. 1, p. 56–64, 2008.

CORDEIRO, Bárbara F. *et al.* Whey protein isolate-supplemented beverage, fermented by *Lactobacillus casei* BL23 and *Propionibacterium freudenreichii* 138, in the prevention of mucositis in mice. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. SEP, p. 1–18, 2018.

CREMER, Jonas; ARNOLDINI, Markus; HWA, Terence. Effect of water flow and chemical environment on microbiota growth and composition in the human colon. v. 114, n. 25, p. 6438–6443, 2017.

CROSNIER, Cécile; STAMATAKI, Despina; LEWIS, Julian. Organizing cell renewal in the intestine: Stem cells, signals and combinatorial control. *Nature Reviews Genetics*, v. 7, n. 5, p. 349–359, 2006.

CRYAN, John F.; KAUPMANN, Klemens. Don't worry "B" happy!: A role for GABA B receptors in anxiety and depression. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 26, n. 1, p. 36–43, 2005.

DARBY, Trevor M. *et al.* *Lactococcus Lactis* Subsp. *cremoris* Is an Efficacious Beneficial Bacterium that Limits Tissue Injury in the Intestine. *iScience*, v. 12, p. 356–367, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.01.030>>.

DINAN, Timothy G.; CRYAN, John F. Microbes Immunity and Behavior: Psychoneuroimmunology Meets the Microbiome. *Neuropsychopharmacology*, v. 42, n. 1, p. 178–192, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/npp.2016.103>>.

DONATO, Kevin A. *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* GG attenuates interferon- γ and tumour necrosis factor- α -induced barrier dysfunction and pro-inflammatory signalling. *Microbiology*, v. 156, n. 11, p. 3288–3297, 2010.

DURISKO, Zachary; MULSANT, Benoit H.; ANDREWS, Paul W. An adaptationist perspective on the etiology of depression. *Journal of Affective Disorders*, v. 172, p. 315–323, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2014.09.032>>.

FAO/WHO. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.* ; World Health Organization and Food and Agriculture Organization. [S.l: s.n.], 2002

FATEMI, S. H. *et al.* Expression of GABA_A A2-, B1-and e-receptors are altered significantly in the lateral cerebellum of subjects with schizophrenia, major depression and bipolar disorder. *Translational Psychiatry*, v. 3, n. 9, p. 1–13, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/tp.2013.64>>.

FEMIA, Angelo Pietro *et al.* Mucin depleted foci, colonic preneoplastic lesions lacking Muc2, show up-regulation of Tlr2 but not bacterial infiltration. *PLoS ONE*, v. 7, n. 1, 2012.

FESSLER, MICHAEL B.; RUDEL, LAWRENCE L.; BROWN, Mark. Vertebrate Intestinal Endoderm Development. *Bone*, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008.

GARRETT, Michelle G. Rooks and Wendy S. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Physiology & behavior*, v. 176, n. 10, p. 139–148, 2017. Disponível em: <[file:///C:/Users/Carla Carolina/Desktop/Artigos para acrescentar na qualificação/The impact of birth weight on cardiovascular disease risk in the.pdf](file:///C:/Users/Carla%20Carolina/Desktop/Artigos%20para%20acrescentar%20na%20qualifica%C3%A7%C3%A3o/The%20impact%20of%20birth%20weight%20on%20cardiovascular%20disease%20risk%20in%20the.pdf)>.

GELBERG, Howard B. Comparative anatomy, physiology, and mechanisms of disease production of the esophagus, stomach, and small intestine. *Toxicologic Pathology*, v. 42, n. 1, p. 54–66, 2014.

GLEESON, M H; CULLEN, J; DOWLING, R. H. Intestinal structure and function after small bowel by-pass in the rat. *Clinical Science*, v. 43, p. 731–742, 1972.

GOZAL, Evelyne *et al.* Tyrosine hydroxylase expression and activity in the rat brain: Differential regulation after long-term intermittent or sustained hypoxia. *Journal of Applied Physiology*, v. 99, n. 2, p. 642–649, 2005.

HILL, Colin *et al.* Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.

HOLZER, Peter; FARZI, Aitak. Neuropeptides and the microbiota- Gut-brain axis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 817, p. 196–219, 2014.

HOOPER, Lora V.; MACPHERSON, Andrew J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology*, v. 10, n. 3, p. 159–169, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri2710>>.

HOP, Huynh Tan *et al.* Interleukin 10 suppresses lysosome-mediated killing of *Brucella abortus* in cultured macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, v. 293, n. 9, p. 3134–3144, 2018.

HUNG, Tran Van; SUZUKI, Takuya. Dietary fermentable fibers attenuate chronic kidney disease in mice by protecting the intestinal barrier. *Journal of Nutrition*, v. 148, n. 4, p. 552–561, 2018.

JEON, Seong Gyu *et al.* Probiotic *Bifidobacterium breve* induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon. *PLoS Pathogens*, v. 8, n. 5, p. 1–15, 2012.

JEONG, Hyerhan *et al.* Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression by retinoic acid receptor. *Journal of Neurochemistry*, v. 98, n. 2, p. 386–394, 2006.

JOHANSSON, Malin E.V.; HANSSON, Gunnar C. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nature Reviews Immunology*, v. 16, n. 10, p. 639–649, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri.2016.88>>.

KARISSETTY, Bhanu Chandra *et al.* Differential effect of chronic stress on mouse hippocampal memory and affective behavior: Role of major ovarian hormones. *Behavioural Brain Research*, v. 318, p. 36–44, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.10.034>>.

LA FATA, Giorgio; WEBER, Peter; MOHAJERI, M. Hasan. Probiotics and the Gut Immune System: Indirect Regulation. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 10, n. 1, p. 11–21, 2018.

LILLY, Daniel M.; STILLWELL, Rosalie H. Tetrahymena favored the growth of. *Science*, v. 147, n. 3659, p. 747–748, 1965.

LOU, Qiong *et al.* MiR-448 targets IDO1 and regulates CD8+ T cell response in human colon cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2019.

LUCIA, D. *et al.* Periconceptional maternal alcohol consumption leads to behavioural changes in adult and aged offspring and alters the expression of hippocampal genes associated with learning and memory and regulators of the epigenome. *Behavioural Brain Research*, v. 362, n. January, p. 249–257, 2019. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.01.009>>.

MACKOWIAK, Philip A. Recycling Metchnikoff: Probiotics, the Intestinal Microbiome and the Quest for Long Life. *Frontiers in Public Health*, v. 1, n. November, p. 1–3, 2013. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpubh.2013.00052/abstract>>.

MAO, Zhuo *et al.* Deficiency of ZnT8 promotes adiposity and metabolic dysfunction by increasing peripheral serotonin production. *Diabetes*, v. 68, n. 6, p. 1197–1209, 2019.

MAQUEDA, Mercedes *et al.* Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 32, n. 1, p. 2–22, 2008.

MARKOWIAK, Paulina; ŚLIZEWSKA, Katarzyna. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, v. 9, n. 9, 2017.

MARTIN, Clair R. *et al.* *The Brain-Gut-Microbiome Axis*. CMGH. [S.l.]: Elsevier Inc. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.04.003>>. , 2018

MARTÍN, Rebeca *et al.* Using murine colitis models to analyze probiotics-host interactions. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 41, n. June, p. S49–S70, 2017.

MHATRE V. HO AND KELSEY C. MARTIN, Ji-Ann Lee. Pilot study of Biomarkers for predicting effectiveness of ramosetron in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: expression of S100A10 and polymorphisms of TPH1. *Bone*, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2012. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>>.

MODY, I. *et al.* Bridging the cleft at GABA synapses in the brain. *Trends in Neurosciences*, v. 17, n. 12, p. 517–525, 1994.

MUKHERJEE, Tanushree *et al.* Epidermal Growth Factor Receptor-Responsive Indoleamine 2,3-Dioxygenase Confers Immune Homeostasis during *Shigella flexneri* Infection. *Journal of Infectious Diseases*, v. 219, n. 11, p. 1841–1851, 2019.

MUKHTAR, Kashif; NAWAZ, Hasham; ABID, Shahab. *Functional gastrointestinal disorders and gut-brain axis: What does the future hold? World Journal of Gastroenterology*. [S.l.: s.n.], 2019