

EFEITO DA KOMAGATAELLA PASTORIS KM71H EM REVERTER A DISBIOSE INTESTINAL INDUZIDA PELO USO DE CLINDAMICINA EM CAMUNDONGOS

AIRTON SINOTT¹; PALOMA TABORDA BIRMANN²; RAFAEL RODRIGUES RODRIGUES³; FABRICIO R. CONCEIÇÃO⁴; LUCIELLI SAVEGNAGO⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – antsinott@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – rafaelr458@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – paloma_birmann@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – luciellisavegnago@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O intestino tem sido considerado o segundo cérebro devido a comunicação bidirecional com o sistema nervoso central (SNC), e a microbiota intestinal exerce uma influência substancial nesta comunicação, assim, esses três componentes cunham o termo eixo microbiota-intestino-cérebro (MIC) (CRYAN, 2019).

Nesse sentido, uma microbiota diversificada é vantajosa ao hospedeiro, uma vez que irá proporcionar inúmeros benefícios, incluindo preservar a integridade da barreira intestinal (CRYAN, 2019). Entretanto, a disbiose, ou seja, um desequilíbrio na composição da microbiota intestinal, pode causar malefícios ao organismo, incluindo ao SNC, especialmente através do comprometimento da barreira intestinal.

Sabe-se que o uso excessivo de antibacteriano pode causar disbiose, pois reduzem a diversidade da microbiota intestinal. Nesse contexto, um estudo desenvolvido por BUFFIE e colaboradores (2012) demonstrou que a injeção intraperitoneal de clindamicina (200 µg) provocou disbiose em roedores. Cabe ressaltar que a disbiose pode provocar mudanças no ambiente intestinal, como aumento das espécies reativas, as quais podem oxidar as proteínas e lipídeos que compõem a barreira intestinal, tornando-a mais permeável. Esse aumento da permeabilidade intestinal permite que metabólitos bacterianos nocivos, como lipopolissacarídeos, saem do lúmen intestinal e atinjam o SNC, causando neuroinflamação. Estas vias biológicas alteradas podem desencadear os transtornos neuropsiquiátricos, incluindo a depressão. Dados apontam que pacientes deprimidos possuem uma microbiota menos diversificada e um aumento dos níveis de espécies reativas quando comparados aos indivíduos saudáveis (LIANG, 2018; BHATT, 2020).

Desta maneira, o uso de probióticos está ganhando espaço como estratégia de tratamento para diversas doenças, incluindo os transtornos neuropsiquiátricos, uma vez que muitos microrganismos podem ser benéficos à saúde, principalmente através da modulação da microbiota intestinal (MÖRKL, 2020). A *Komagataella pastoris* é uma levedura metilotrófica da família Saccharomycetaceae e gênero *Komagataella* e recentemente foi caracterizada suas propriedades probióticas (FRANÇA, 2015) bem como o seu efeito antidepressivo, antioxidante e imunomodulador em camundongos (BIRMANN, 2021).

A partir do que foi exposto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as propriedades probióticas da cepa da *K. pastoris* KM71H em restaurar a diversidade da microbiota intestinal e reduzir a produção de espécies reativas em camundongos submetidos a disbiose intestinal pelo uso de clindamicina.

2. METODOLOGIA

2.1 Preparo da levedura

A *K. pastoris* KM71H foi diluída em 500 µL de tampão fosfato-salino (PBS) para obter 8 log UFC.g⁻¹. Para avaliação da viabilidade e estabilidade, as leveduras foram quantificadas (UFC.g⁻¹) a cada 15 dias.

2.2 Animais

Camundongos Swiss machos (25-35 g) foram utilizados e mantidos em um ciclo claro/escuro de 12h, iniciando às 7h da manhã, à temperatura ambiente (22 ± 1°C), com livre acesso a água e comida, contendo 5 camundongos por caixa (CEEA-11133-20).

2.3 Delineamento experimental

O protocolo experimental (**Fig.1**) teve quatro grupos (n= 8-10 animais): G1: salina + PBS; G2: Salina + *K. pastoris* KM71H; G3: clindamicina + PBS e G4: clindamicina + *K. pastoris* KM71H. No primeiro dia foi administrado 200 µg de clindamicina pela via intraperitoneal. Após 24h, os camundongos receberam a *K. pastoris* KM71H durante 14 dias na concentração de 8 log UFC.g⁻¹ pela via intragástrica (i.g). No 16º dia foi realizada a coleta das fezes e a eutanásia por overdose de isoflurano para a coleta do intestino delgado para análises *ex vivo* de espécies reativas (LOETCHUTINAT, 2005). Para a análise da microbiota, as fezes foram enviadas para a empresa Neopropecta Microbiome Technologies a qual realizou sequenciamento do gene do RNA ribossomal 16S (16S rRNA).

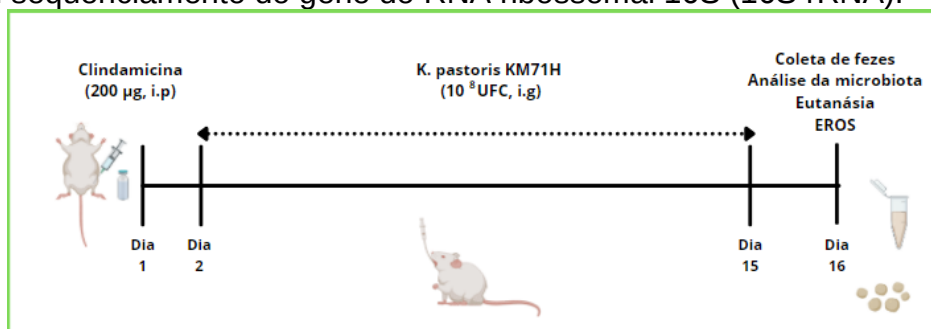


Fig. 1 - Delineamento experimental do projeto (i.p= intraperitoneal, EROS = espécies reativas ao oxigênio, i.g= intragástrica).

2.4 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média e considerados significativos quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas pela análise de variância de duas vias seguidas pelos testes de post hoc Tukey através do software GraphPad Prism 8.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento com *K. pastoris* KM71H foi eficaz em reverter a disbiose intestinal causada pela administração da clindamicina (**fig. 2**). A administração da clindamicina alterou a composição da microbiota intestinal dos camundongos quando comparados ao grupo controle, diminuindo a diversidade da microbiota intestinal e favorecendo a predominância da família *enterobacteriaceae*. No grupo tratado com *K. pastoris*, houve um aumento na concentração dos microrganismos pertencentes a família *bacteroidaceae* e *lactobacillaceae* e impediu o aumento das

bactérias da família *enterobacteriaceae*, quando comparado ao grupo clindamicina, promovendo uma modulação da microbiota.

A figura 2B mostra que a administração da clindamicina aumentou os níveis de espécies reativas no intestino delgado quando comparado ao controle, e a administração com a *K. pastoris* KM71H diminuiu os níveis de espécies reativas nos camundongos induzidos pela disbiose intestinal.

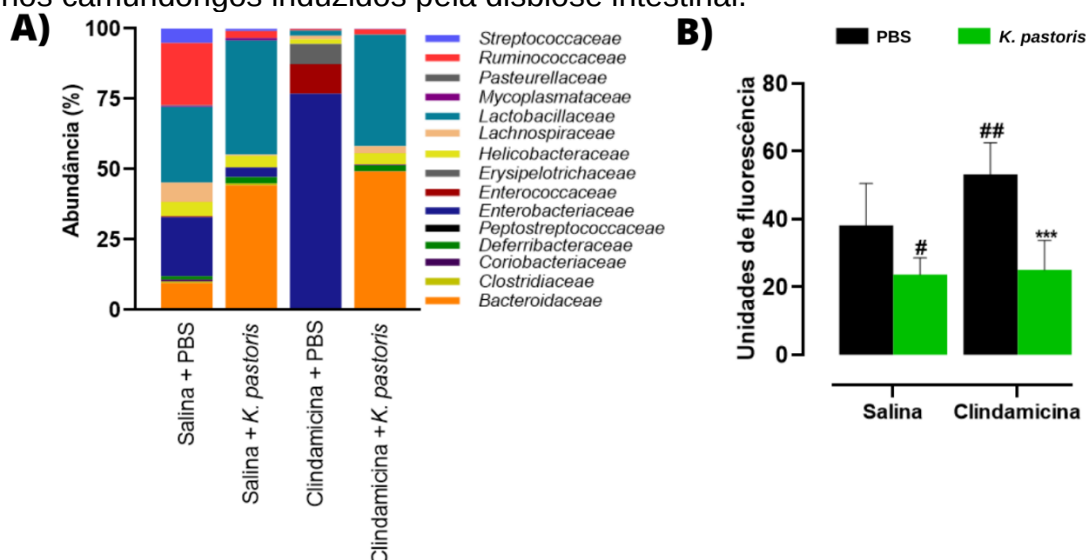


Fig. 2. (A) Efeito da *K. pastoris* KM71H na modulação da diversidade da microbiota intestinal medido em % de abundância de cada família, em camundongos submetidos a clindamicina. (B) Efeito da *K. pastoris* KM71H na redução de espécies reativas ao oxigênio no intestino, medido em unidades de fluorescência, em camundongos submetidos a clindamicina. Os dados estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média (n=8-10). # p < 0,05 e ### p < 0,001 quando comparados com o grupo controle e ***p < 0,001 quando comparados com o grupo induzido. PBS: Tampão fosfato-salino. Clind: clindamicina.

Apesar de necessário, o uso de antibacterianos deve ser estrategicamente utilizado, pois embora controle infecções bacterianas, eles podem reduzir a diversidade da microbiota intestinal, causando disbiose. A disbiose provoca mudanças no ambiente intestinal, como por exemplo o aumento de espécies reativas e diminuição da integridade da barreira intestinal (RAMIREZ, 2020).

Neste estudo, a clindamicina provocou uma redução da diversidade da microbiota intestinal caracterizado principalmente pelo aumento da família *enterobacteriaceae*, um grupo de bactérias Gram negativas e que em grande parte é patogênica, a qual pode causar mudanças no sistema imune e consequentemente, transtornos psicológicos (JIANG, 2015). Esse resultado vai de encontro com o aumento das espécies reativas provocado pela administração de clindamicina, mostrando a relação da disbiose intestinal com o aumento das espécies reativas (MU, 2019). Felizmente, estudos demonstram que alguns microrganismos apresentam características probióticas e podem ser utilizados para restaurar a diversidade (WIEËRS, 2020).

Nesse sentido, a *K. pastoris* modulou a microbiota intestinal impedindo o aumento de bactérias da família *enterobacteriaceae* e proporcionando um aumento das famílias *bacteroidaceae* e *lactobacillaceae* as quais parecem estar envolvidas na prevenção da integridade da barreira intestinal, assim diminuindo as espécies reativas ao oxigênio no intestino. Interessantemente, o desequilíbrio da microbiota e o aumento de espécies reativas são fatores que são encontrados em pacientes

depressivos, e o transplante fecal de pessoas saudáveis para pacientes depressivos mitiga a depressão (LI, 2019), mostrando a importância de uma microbiota saudável e diversa.

4. CONCLUSÕES

A *K. pastoris* KM71H se demonstrou um probiótico promissor para restaurar a diversidade da microbiota intestinal e reduzir os níveis de espécies reativas ao oxigênio no intestino em resposta a disbiose provocada pelo uso da clindamicina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BHATT, Shvetank; et al. Role of oxidative stress in depression. **Drug Discovery Today**, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2020.05.001>.
- CRYAN, J et al. The Microbiota-Gut-Brain Axis. **Physiological Reviews**, 1 out. 2019. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>.
- GUIDA, F et al. Antibiotic-induced microbiota perturbation causes gut endocannabinoidome changes, hippocampal neuroglial reorganization and depression in mice. **Brain, Behavior, And Immunity**, 67, 230-245 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.09.001>
- JIANG, Haiyin; et al . Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. **Brain, Behavior, And Immunity**, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2015.03.016>.
- LI, Nannan; et al. Fecal microbiota transplantation from chronic unpredictable mild stress mice donors affects anxiety-like and depression-like behavior in recipient mice via the gut microbiota-inflammation-brain axis. **Stress**, 24 maio 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10253890.2019.1617267>.
- LIANG, et al . Recognizing Depression from the Microbiota–Gut–Brain Axis. **International Journal Of Molecular Sciences**, 29 maio 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19061592>.
- MÖRKEL, S et al. Probiotics and the Microbiota-Gut-Brain Axis: focus on psychiatry. **Current Nutrition Reports**, 13 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13668-020-00313-5>.
- MU, Chunlong; et al. Antibiotic effects on gut microbiota, metabolism, and beyond. **Applied Microbiology And Biotechnology**, 7 nov. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-019-10165-x>.
- RAMIREZ, Jaime; et al. Antibiotics as Major Disruptors of Gut Microbiota. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, 24 nov. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2020.572912>.
- THERON, C et al. Integrating metabolic modeling and population heterogeneity analysis into optimizing recombinant protein production by *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, 14 nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-017-8612-y>.
- WIEËRS, Grégoire; et al. How Probiotics Affect the Microbiota. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, 15 jan. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2019.00454>.