

## EFEITO DO TIPO ANTIDEPRESSIVO DA *KOMAGATAELLA PASTORIS* KM71H: MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL EM CAMUNDONGOS

PALOMA TABORDA BIRMANN<sup>1</sup>; RAFAEL RODRIGUES RODRIGUES<sup>2</sup>;  
ANGELA MARIA CASARIL<sup>3</sup>; ANA PAULA PESARICO<sup>4</sup>; FABRÍCIO ROCHEDO  
CONCEIÇÃO<sup>5</sup> e LUCIELLI SAVEGNAGO<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – paloma\_birmann@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas – rafaelr458@gmail.com,

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – angela.casaril@gmail.com,

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – anappesarico@gmail.com;

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – luciellisavegnago@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

A *Komagataella pastoris* é uma levedura frequentemente encontrada em árvores e foi proposta como um potencial agente probiótico (França et al., 2015; Gil de Los Santos et al., 2018; Birmann et al., 2021). Recentemente Birmann e colaboradores (2021) mostraram que essa levedura tem efeitos antidepressivos, antioxidantes e imunomodulatórios promissores em modelos animais de depressão.

Estudos apontam que pacientes com transtorno depressivo maior (TDM) apresentam alterações na composição da microbiota intestinal quando comparados a indivíduos saudáveis (Blackwood et al., 2017; Cheng et al., 2019). Desta maneira, os probióticos vêm ganhando atenção, pois podem ser capazes de reduzir os sintomas depressivos por diversos mecanismos, incluindo a modulação da microbiota intestinal (Cheng et al., 2019). Além disso, um aumento da permeabilidade intestinal, provavelmente associado a alterações na microbiota intestinal, parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento de algumas doenças inflamatórias e suas comorbidades, incluindo o TDM (Camilleri, 2019; Mayer, 2011).

Uma das principais causas de mudanças na composição da microbiota intestinal, conhecida como disbiose, é o uso de antibacterianos, pois reduzem a diversidade de espécies bacterianas. Buffie e colaboradores (2012) mostraram que uma única dose de clindamicina (200 µg, intraperitoneal [i.p]) reduziu drasticamente a diversidade da microbiota intestinal em camundongos por pelo menos 28 dias.

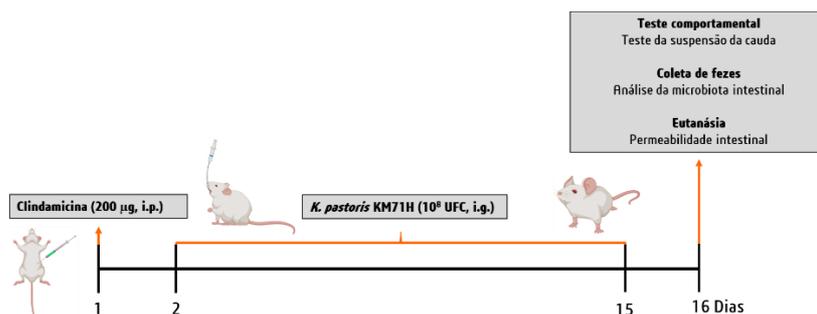
Portanto, agentes terapêuticos capazes de restaurar o equilíbrio da microbiota intestinal têm sido propostos como uma nova estratégia para o tratamento de transtornos psiquiátricos, e os probióticos são de extrema importância nesse cenário. Com base nessas evidências, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tipo antidepressivo da *K. pastoris* KM71H em um modelo de disbiose induzida por antibacterianos, bem como a modulação da microbiota intestinal e a integridade da barreira intestinal.

### 2. METODOLOGIA

Os camundongos *Swiss* machos receberam clindamicina (200 µg, i.p.) e após 24h foram tratados com *K. pastoris* KM71H em uma dose de 8 log UFC.g<sup>-1</sup>/animal por via intragástrica (i.g.) ou PBS (veículo, i.g.) durante 14 dias consecutivos. Posteriormente, os animais foram submetidos ao teste da suspensão da cauda (Porsolt et al., 1977), para avaliar o efeito do tipo antidepressivo, e foi

realizado a coleta de fezes (de maneira espontânea) para análise da composição da microbiota intestinal por meio do sequenciamento de microbioma 16S rRNA (Neoprosecta).

Para a verificar a permeabilidade intestinal, foi utilizado uma nova coorte de animais, seguindo os mesmos tratamentos descritos acima. No 16ª dia os animais receberam Fitc-D4000 (600 mg/kg, i.g.) e após uma hora foi coletado o sangue. A análise da concentração de Fitc-D4000 no plasma foi realizada em espectrofluorímetro (excitação de 485 nm e emissão de 528 nm) (Cani et al., 2008) (Fig. 1).



**Figura 1.** Delineamento experimental da avaliação do efeito do tipo antidepressivo da *K. pastoris* KM71H em camundongos expostos ao antibacteriano.

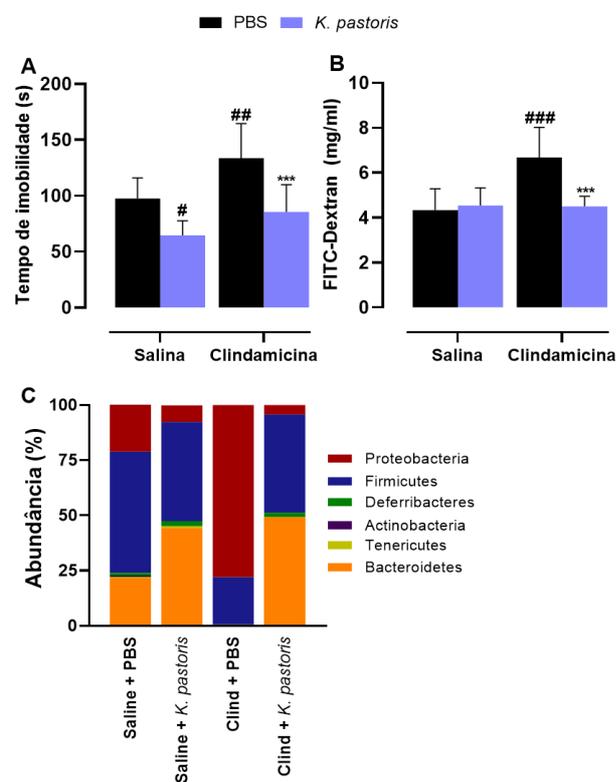
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que a administração de *K. pastoris* KM71H diminuiu o tempo de imobilidade quando comparado ao grupo clindamicina no teste de suspensão da cauda, caracterizando seu efeito do tipo antidepressivo (Fig. 2A). Esse efeito foi acompanhado pela preservação da integridade da barreira intestinal, observado pela diminuição da concentração de Fitc-D4000 no plasma quando comparado ao grupo clindamicina (Fig. 2B) e pela modulação da microbiota intestinal, em que o tratamento com *K. pastoris* K71H aumentou a presença de microrganismos do filo Bacteoidetes e Firmicutes e diminuiu do filo Proteobacteria quando comparado ao grupo clindamicina (Fig. 2C).

Antibacterianos são frequentemente usados para prevenir e tratar infecções bacterianas. No entanto, eles podem ser benéficos ou prejudiciais: por um lado, fornecem defesas contra patógenos microbianos, mas, por outro lado, podem danificar o equilíbrio da microbiota intestinal do hospedeiro (Zhang et al., 2019). A microbiota intestinal desempenha um papel fundamental em várias funções fisiológicas do corpo humano, incluindo resistência à invasão de patógenos, fortalecimento da barreira epitelial intestinal e modulação do sistema imunológico do hospedeiro (Dinan e Cryan, 2017; Hao et al., 2020). Além disso, um conjunto crescente de evidências indica que a microbiota intestinal contribui para a modulação das funções cerebrais e do comportamento humano, enfatizando a importância da microbiota intestinal na patogênese do TDM (Dinan e Cryan, 2017; Hao et al., 2020). Portanto, o TDM é reconhecido como uma patologia associada à microbiota intestinal e ao eixo microbiota-intestino-cérebro (Hao et al., 2020), assim a manipulação da microbiota intestinal por probióticos é uma estratégia terapêutica interessante.

Neste estudo nós demonstramos que a administração oral de *K. pastoris* KM71H melhorou o fenótipo tipo depressivo induzido por antibacteriano, nós acreditamos que este efeito esteja relacionado a modulação da microbiota

intestinal. Além disso, sabe-se que a microbiota intestinal influencia na função da barreira intestinal (Al-Sadi et al., 2021). O epitélio intestinal é uma barreira física natural que evita que bactérias intestinais patogênicas e seus subprodutos metabólicos sejam transferidos para o sangue. Estudos comprovam que a disbiose e a disfunção da barreira intestinal, aumentando a permeabilidade intestinal, permitem que os bioprodutos da microbiota intestinal, por exemplo o lipopolissacarídeos (LPS), entrem na circulação e alcancem o sistema nervoso central, desencadeando a neuroinflamação e, conseqüentemente, podendo levar ao desenvolvimento do TDM (Al-Sadi et al., 2021; Braniste et al., 2014; Fan e Pedersen, 2020). Interessantemente, neste estudo nós mostramos que a *K. pastoris* HM71H foi capaz de prevenir a integridade da barreira intestinal, assim, contribuindo para o seu efeito do tipo antidepressivo.



**Figura 2.** Efeito do tratamento com *K. pastoris* KM71H em camundongos no tempo de imobilidade no teste da suspensão da cauda (A), na permeabilidade da barreira intestinal (B) e na análise da microbiota intestinal (C). Os dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$  quando comparados com o grupo controle. \*\*\* $p < 0,001$  quando comparados com o grupo clindamicina. Clind: clindamicina; PBS: Tampão fosfato-salino.

#### 4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que fornecemos evidências para apoiar que a *K. pastoris* KM71H é um promissor microrganismos para o desenvolvimento de um novo probiótico com um efeito antidepressivo.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-SADI, R., NIGHOT, P., NIGHOT, M., HAQUE, M., RAWAT, M., e MA, T. Y. Lactobacillus acidophilus Induces a Strain-specific and Toll-Like Receptor 2-Dependent Enhancement of Intestinal Epithelial Tight Junction Barrier and Protection Against Intestinal Inflammation. **Am J Pathol**, v. 191, n. 5, p. 872-888, 2021.
- BLACKWOOD, B. P., YUAN, C. Y., WOOD, D. R., NICOLAS, J. D e HUNTER, C. J. Probiotic Lactobacillus Species Strengthen Intestinal Barrier Function and Tight Junction Integrity in Experimental Necrotizing Enterocolitis. **J Probiotics Health**, v, 5, n. 1, p, 745-753, 2017.
- BRANISTE, V., AL-ASMAKH, M., KOWAL, C., ANUAR, F., ABBASPOUR, A., TÓTH, M., KORECKA, A., BAKOCEVIC, N., NG, L. G., e KUNDU, P. J. S. T. M. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 263, p. 263-158, 2014.
- BIRMANN, P.T, CASARIL, A.M., PESARICO, A.P, CABALLERO, P, ROGRIGUES, R.R. et al. Komagataella pastoris KM71H modulates neuroimmune and oxidative stress parameters in animal models of depression: A proposal for a new probiotic with antidepressant-like effect. **Pharmacological Research** ,in press, 2021.
- BUFFIE, C. G., JARCHUM, I., EQUINDA, M., LIPUMA, L., GOBOURNE, A., VIALE, A., UBEDA, C., XAVIER, J., E PAMER, E. G. Profound alterations of intestinal microbiota following a single dose of clindamycin results in sustained susceptibility to Clostridium difficile-induced colitis. **Infect Immun**, v. 80, n. 1, p. 62-73, 2012.
- CAMILLERI, M. J. G. Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans. **Gut**, v. 68, n. 8, p. 1516-1526, 2019.
- CANI, P. D., BIBILONI, R., KNAUF, C., WAGET, A., NEYRINCK, A. M., DELZENNE, N. M., e BURCELIN, R. J. D. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet–induced obesity and diabetes in mice. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1470-1481, 2008.
- CHENG, D., SONG, J., XIE, M., SONG, D. The bidirectional relationship between host physiology and microbiota and health benefits of probiotics: A review. **Nutr Neurosci**, v. 91, n. 9, p. 426-435, 2019.
- DINAN, T. G. e CRYAN, J. F. Brain-Gut-Microbiota Axis and Mental Health. **Psychosom Med**, v. 79, n. 8, p. 920-926, 2017.
- FAN, Y., & PEDERSEN, O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. **Nat Rev Microbiol**. v. 19,n. 1, p. 55-71, 2020.
- FRANCA, R. C., CONCEICAO, M., HAUBERT, L., SABADIN, G., DE OLIVEIRA, P. D., AMARAL, M. G., SILVA, W. P., e MOREIRA, A. N. Pichia pastoris X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against Salmonella Typhimurium. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99, n. 19, p. 7953-7961, 2015.
- GIL DE LOS SANTOS, J. R., GIL-TURNES, C., GABOARDI, G., FERNANDES S., L., FRANCA, R., E ROCHEDO F. Probiotic effect of Pichia pastoris X-33 produced in parboiled rice effluent and YPD medium on broiler chickens. **PLoS One**, v. 13, n. 2, 192908, 2018.
- HAO, W. Z., LI, X. J., ZHANG, P. W., e CHEN, J. X. A review of antibiotics, depression, and the gut microbiome. **Psychiatry Res**, v. 284, n. 1, p. 112691, 2020.
- MAYER, E. A. Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication. **Nat Rev Neurosci**, v. 12, n. 8, p. 453-466, 2011.
- PORSOLT, R. D., BERTIN, A., e JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 229, n. 2, p. 327-336, 1977.