

EFEITO DO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA *KOMAGATAELLA PASTORIS* KM71H ATRAVÉS DA MODULAÇÃO NEUROENDÓCRINA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE DE RESTRIÇÃO

PALOMA T. BIRMANN¹; ANGELA M. CASARIL¹; PAMELA S. CABALLERO²; RAFAEL R. RODRIGUES²; FABRÍCIO R. CONCEIÇÃO²; LUCIELLI SAVEGNAGO³.

¹ Universidade Federal de Pelotas – Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia.
paloma_birmann@hotmail.com; angela.casaril@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – Laboratório de Imunologia Aplicada.
pamelasaccaffuni@gmail.com; rafaelr458@gmail.com; fabricao.rochedo@ufpel.edu.br

³ Universidade Federal de Pelotas – Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia.
lucielisavegnago@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A *Komagataella pastoris* é uma levedura metilotrófica que vive em árvores, pertencente ao reino Fungi, família Saccharomycetaceae e gênero *Komagataella* (De Schutter et al., 2009). A capacidade metilotrófica desta levedura a torna capaz de crescer em meio contendo metanol como única fonte de carbono, devido à presença da enzima álcool oxidase I e II (AOX1 e AOX2) (De Schutter et al., 2009; Ahmad et al., 2014). Os genes AOX1 e AOX2 também servem como promotores para a produção de proteínas recombinantes, tornando este microrganismo um sistema amplamente utilizado para a expressão de proteínas heterólogas (Ahmad et al., 2014), mas informações sobre seu uso para outros fins são escassas. Notavelmente, um estudo sugeriu que *K. pastoris* poderia ter efeitos probióticos promissores (Franca et al., 2015). De fato, nos últimos anos, tem havido um interesse crescente na utilização de microrganismos que ofereçam benefícios à saúde do hospedeiro, os chamados probióticos, que têm a capacidade de modular a microbiota intestinal (Mayer, 2011).

Sabe-se que a influência da microbiota intestinal se estende além do trato gastrointestinal (TGI), participando da comunicação bidirecional entre o TGI e o sistema nervoso central (SNC) (Mayer, 2011; Forsythe et al., 2016). Nesse sentido, surgiu o conceito do eixo microbiota-intestino-cérebro (MIC) para sugerir que não apenas o cérebro pode afetar a função intestinal, mas que o intestino também pode induzir alterações no SNC e, portanto, tem sido utilizado para descrever a complexa comunicação entre a microbiota, o intestino e o SNC (Fung et al., 2017; Martin e Mayer, 2017).

Um dos mecanismos que pode modular a comunicação do eixo MIC é o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), o qual é responsável por coordenar as respostas fisiológicas a estressores exógenos e endógenos (Cussotto et al., 2018). Evidências sugerem que o estresse pode aumentar a permeabilidade da barreira intestinal e ativar respostas imunes, e como consequência, influenciar o comportamento (Cussotto et al., 2018). Essa comunicação bidirecional é particularmente relevante durante o estresse e em transtornos relacionados ao estresse, como transtorno depressivo maior (TDM), e essa associação levou à exploração da manipulação da microbiota intestinal para aliviar os sintomas depressivos (Sun et al., 2019).

Desta maneira, neste estudo investigou se a manipulação intestinal por meio da administração de *K. pastoris* KM71H atenuaria alterações

comportamentais e neuroendócrinas no modelo de comportamento do tipo-depressivo induzido por estresse de restrição em camundongos.

2. METODOLOGIA

2.1. PREPARO DA LEVEDURA

Foram diluídos em 500 μL de tampão fosfato-salino (PBS) 8 log CFU.g⁻¹ de *K. Pastoris*, e a cada 7 dias as leveduras foram quantificadas (CFU.g⁻¹) para avaliação da viabilidade e estabilidade.

2.2. ANIMAIS

Para o desenvolvimento deste projeto foram utilizados camundongos Swiss machos (25 - 35g). Os animais foram mantidos em cinco animais por cada caixa, em um ciclo claro/escuro de 12 h com luzes acesas às 7:00 da manhã, à temperatura ambiente ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e com acesso livre a água e comida (CEEA 12505-2019).

2.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O protocolo experimental teve como principal objetivo investigar o efeito tipo-antidepressivo do tratamento com *K. pastoris* KM71H em camundongos com comportamento tipo-depressivos induzido por estresse de restrição, com foco na modulação do parâmetro neuroendócrino (Figura 1). Para isso, os animais foram divididos em quatro grupos: (1) sem estresse de restrição + PBS (grupo PBS); (2) sem estresse de restrição + *K. pastoris* KM71H; (3) estresse de restrição + PBS (grupo de estresse); (4) estresse de restrição + *K. pastoris* KM71H. Os camundongos foram tratados com *K. pastoris* KM71H (concentração 8 log UFC.g⁻¹/por animal, pela via intragástrica [i.g.]) ou PBS (500 μL , i.g.) durante 14 dias consecutivos. Do 8º ao 14º dia, 30 min após os tratamentos, os animais foram submetidos a 1 h de estresse de restrição em tubos fenestrados (Casaril et al. 2019a). Após esse período de imobilização, os animais foram higienizados e colocados de volta em suas gaiolas. No 15º dia, 24 h após a última administração foi realizado o teste da suspensão da cauda (TSC). Em seguida, os camundongos foram anestesiados por inalação de isoflurano e em seguida foi coletado o sangue por punção cardíaca para determinação dos níveis plasmáticos de corticosterona.

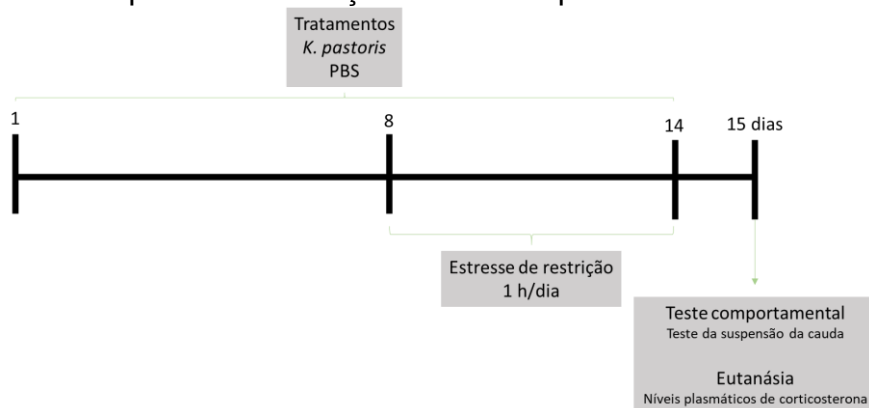


Figura 1. Delineamento experimental da avaliação do efeito tipo-antidepressivo da *K. pastoris* em camundongos submetidos ao estresse de restrição.

2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ 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 a *K. pastoris* diminuiu o tempo de imobilidade no TSC (Figura 2A) nos camundongos induzidos por estresse de restrição, uma vez que este teste é um parâmetro comportamental bem aceito para avaliar a atividade do tipo-antidepressiva em roedores, no qual um decréscimo significativo no tempo de imobilidade é um indicador do efeito do tipo-antidepressivo. Somando-se a isso, o efeito antidepressivo demonstrado pelo tratamento com a *K. pastoris* pode estar relacionado com a modulação da via neuroendócrina, uma vez a administração desta levedura preveniu o aumento dos níveis de corticosterona plasmática nos animais submetidos ao estresse de restrição (Figura 2B).

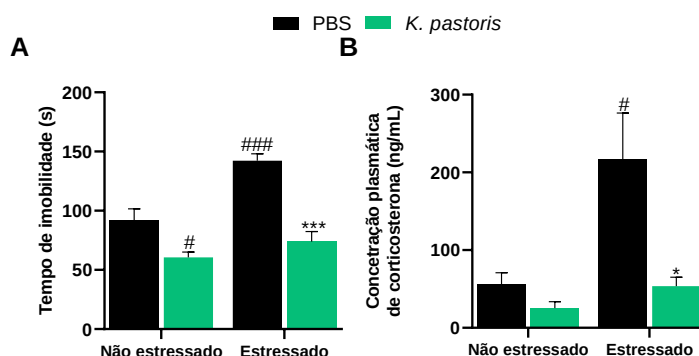


Figura 2. Efeito tipo-antidepressivo da *K. pastoris* no tempo de imobilidade no teste da suspensão da cauda (A) e nos níveis plasmáticos de corticosterona (B). Os dados estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($n=8-10$). # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ quando comparados com o grupo controle. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com o grupo estressado. PBS: Tampão fosfato-salino.

O cérebro e o intestino se comunicam de forma dinâmica e complexa por diferentes vias, formando um eixo bidirecional, cujo equilíbrio depende da composição dos microrganismos que habitam o intestino, a chamada microbiota intestinal (Dinan e Cryan, 2017). Um distúrbio na homeostase da microbiota intestinal (disbiose) tem impacto negativo na saúde do hospedeiro e pode desencadear patologias que afetam o SNC, como o TDM (Forsythe et al., 2016; Dinan e Cryan, 2017). Vários estudos mostraram que o estresse, especialmente o estresse associado à vida diária (como medo de demissões, estresse financeiro e preocupações com os filhos), afeta todo o nosso corpo, incluindo o SNC e o TGI (Amini-Khoei et al., 2019). Pois, em resposta ao estresse, o SNC configura uma cascata de eventos para manter a sobrevivência do organismo e estabilizar o bem-estar, porém quando há uma exposição exacerbada a eventos estressantes ocorre uma maior liberação de cortisol (corticosterona em roedores). Esse aumento exacerbado de níveis circulantes de cortisol desencadeia uma mudança



na composição e funções da barreira intestinal, promovendo o que chamamos de intestino permeável, o que transforma os simbiossomas em patobiossomas, causando maior envolvimento do sistema imunológico, desencadeando um processo inflamatório que pode se espalhar por todo o corpo, atingindo o cérebro (Mayer, 2011; Forsythe et al., 2016). Essas cascatas de eventos estão intimamente associadas ao desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos, incluindo o TDM.

4. CONCLUSÕES

Em resumo, o presente estudo mostrou que o tratamento com *K. pastoris* KM71H apresentou efeito do tipo-antidepressivo em um modelo animal de comportamento tipo-depressivo induzido por estresse. Acreditamos que este efeito pode estar parcialmente relacionado à capacidade da levedura em preverir o aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona. Nesse sentido, a *K. pastoris* KM71H torna-se uma promissora estratégia terapêutica para o tratamento de sintomas depressivos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., Schwab, H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 98, p. 5301-5317, 2014.
- Cusotto, S., Sandhu, K.V., Dinan, T.G., Cryan, J.F. The Neuroendocrinology of the Microbiota-Gut-Brain Axis: A Behavioural Perspective. **Front Neuroendocrinol.** v. 51, p. 80-101, 2018.
- De Schutter, K., Lin, Y.C., Tiels, P., Van Hecke, A., Glinka, S., Weber-Lehmann, J., Rouze, P., Van de Peer, Y., Callewaert, N. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. **Nat Biotechnol.** v. 27, p. 561-566, 2009.
- Forsythe, P., Kunze, W., Bienenstock, J. Moody microbes or fecal phrenology: what do we know about the microbiota-gut-brain axis? **BMC Med.** v. 14, p 58-66, 2016.
- Franca, R.C., Conceicao, F.R., Mendonca, M., Haubert, L., Sabadin, G., de Oliveira, P.D., Amaral, M.G., Silva, W.P., Moreira, A.N. *Pichia pastoris* X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against *Salmonella Typhimurium*. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 99, p. 7953-7961, 2015.
- Fung, T.C., Olson, C.A., Hsiao, E.Y. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. **Nat Neurosci.** v. 20, p. 145-155, 2017.
- Mayer, E.A. Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication. **Nat Rev Neurosci.** v. 12, p. 453-466, 2011.
- Martin, C.R., Mayer, E.A. Gut-Brain Axis and Behavior. **Nestle Nutr Inst Workshop Ser.** v. 88, p. 45-53, 2017.
- Dinan, T.G., Cryan, J.F., Clarke, G., Hyland, N., Roy, N.C. Metabolome and microbiome profiling of a stress-sensitive rat model of gut-brain axis dysfunction. **Sci Rep.** v. 9, p. 14026-14036, 2019.
- Amini-Khoei, H., Haghani-Samani, E., Beigi, M., et al. On the role of corticosterone in behavioral disorders, microbiota composition alteration and neuroimmune response in adult male mice subjected to maternal separation stress. **Int Immunopharmacol.** v.66, p. 242-250, 2019.