



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

KAÍQUE YAGO GERVAZIO DE LIMA

Suplementação com *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC003 reverte o comportamento do tipo depressivo e ansioso **em modelo murino**

JOÃO PESSOA, 2023

KAÍQUE YAGO GERVAZIO DE LIMA

Suplementação de *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC003 promove alteração na microbiota intestinal em modelo murino de depressão e ansiedade

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadores:

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha
Gomes (CBIOTEC/UFPB)

Prof^a Dr^a Mirian Graciela da Silva Stiebbe
Salvadori (CCHLA/UFPB)

João Pessoa

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L732s Lima, Kaíque Yago Gervazio de.

Suplementação de Lactiplantibacillus plantarum
CNP003 promove alteração na microbiota intestinal em
modelo murino de depressão e ansiedade / Kaíque Yago
Gervazio de Lima. - João Pessoa, 2023.
56 f. : il.

Orientação: Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes,
Orientação: Mirian Graciela da S. S. Salvadori.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBIOTEC.

1. Distúrbios emocionais. 2. Dexametasona. 3.
Lactiplantibacillus plantarum CNP003. 4. Microbiota
intestinal. I. Gomes, Ulrich Vasconcelos da Rocha. II.
Salvadori, Mirian Graciela da Silva Stiebbe. III.
Título.

UFPB/BC

CDU 616.89(043)



Ata da 38ª (trigésima oitava) Dissertação de Mestrado do aluno do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia KAÍQUE YAGO GERVAZIO DE LIMA candidato ao Título de "Mestre" em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia Aplicada aos Recursos Renováveis.

Às quatorze horas (14h00) do dia 28 de março do ano de dois mil e vinte e três (28/03/2023), na sala 10 do Bloco administrativo do CBIOTEC/UFPB, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o aluno **Kaíque Yago Gervazio de Lima** candidato ao Título de "MESTRE" em Biotecnologia. Foram componentes da Banca Examinadora os professores doutores Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (Orientador/Presidente) (Universidade Federal da Paraíba); Tatjana Keesen Souza Lima Clemente (Examinador Interno) (Universidade Federal da Paraíba) e Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio (Examinador Externo) (Universidade Federal da Paraíba). Dando início aos trabalhos, o Presidente da Banca professor Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o candidato **Kaíque Yago Gervazio de Lima**, a quem concedeu palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado "Suplementação com *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC003 reverte o comportamento do tipo depressivo e ansioso em modelo murino". Após discorrer sobre o referido tema, o candidato foi arguido pelos examinadores na forma Regimental. Em seguida, passou a Comissão em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADO. Em face da aprovação, declarou o presidente achar-se o examinado **Kaíque Yago Gervazio de Lima** legalmente habilitado a receber o Título de "MESTRE" em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia Aplicada aos Recursos Renováveis, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito a expedição do Diploma que o mesmo faz jus. Nada mais havendo a tratar, eu, Tânia Maria Alves de Araújo, na qualidade de secretária, lavrei a presente Ata que submeto a aprovação da Comissão Examinadora.

Tânia Maria Alves de Araújo (Secretária)

Prof. r. Ulrich Vasconcelos da Rocha (Orientador)

Profa. Dra. Tatjana Keesen Souza Lima Clemente (Examinador Interno)

Profa. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio (Examinador Externo)

Emitido em 28/03/2023

ATA Nº 01/2023 - CBIOTEC - DB (18.62)
(Nº do Documento: 1)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 17/04/2023 10:03)

TANIA MARIA ALVES DE ARAUJO

SECRETARIO

336203

(Assinado digitalmente em 17/04/2023 11:49)

ULRICH VASCONCELOS DA ROCHA GOMES

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

2009494

(Assinado digitalmente em 17/04/2023 09:59)

TATJANA KEESEN DE SOUZA LIMA CLEMENTE

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

1889422

(Assinado digitalmente em 17/04/2023 10:06)

ADRIANA MARIA FERNANDES DE OLIVEIRA

GOLZIO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

1864672

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufpb.br/documentos/> informando seu número: 1, ano: **2023**, documento (espécie): **ATA**, data de emissão: **17/04/2023** e o código de verificação: **10bc56868e**

Dedico este trabalho a todos que sempre se fizeram presente em minha vida, em especial a meu amor, minha família, mestres e amigos.

AGRADECIMENTOS

À minha família por me incentivar a sair de casa e seguir meu próprio caminho e não medir esforços pela minha educação desde seu princípio, por me dar os valores que carrego e fundamentam meu eu.

É inconcebível o quanto eu sou grato a meu maior amor, Julia, companheira de laboratório, aventuras, vida! Esse trabalho é uma cria conjunta unindo tudo que sempre quis pesquisar e você foi quem me ajudou a conceber. Serei eternamente grato e estarei eternamente ao teu lado agradecendo.

Aos meus sogros, Nobilino e Socorro, que estiveram apoiando meu crescimento desde o primeiro momento, sou muito grato por todo o incentivo que vocês vêm me dando e pela filha maravilhosa que vocês criaram.

Aos meus amigos que mesmo na pandemia se fizeram presentes, virtualmente, e mesmo longe não desapegam. Aos amigos do pedal João, Thiago, Moacy e Toineto, obrigado por todo apoio e desculpa não ter ido em nenhum pedal. Aos amigos do curso, os mares são pequenos pra nossas histórias, Jorranes e Vini, obrigado por sempre estarem sempre dando um alô no Discord.

Em especial a Camila, *parêa* de outro mestrado, surtando comigo e Julia em todos os laboratórios que nos foram permitido acesso. Obrigado pelo apoio em todas as linhas de pesquisa, até nas que não são minhas.

À UFPB, por ser uma segunda casa, às vezes primeira. Aos meus mestres: Ulrich, mais do que um orientador amigo, um pai acadêmico que me adotou nessa jornada que seguirá. E Mirian que sempre me abriu portas, e até perdoou a que derrubei. Agradeço profundamente toda a confiança e liberdade que me deram para seguir com esse trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, treinados por mim e comigo: Matheus, Beatriz e Godoy que dispuseram de seu tempo e restinho de sanidade para me ajudar. E as minhas amigas de pesquisa Karol e Bel a pelos momentos de estabilidade no meio de cortes inesperados.

E a todos os outros que não citei aqui, mas estão no meu coração, deixo meu agradecimento.

LIMA, Kaíque Yago Gervazio de. Suplementação com *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC003 reverte o comportamento do tipo depressivo e ansioso em modelo murino. João Pessoa, 2023. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba, 2023

RESUMO

Mais de sete milhões de brasileiros são acometidos pelo Transtorno Depressivo Maior (TDM) e pelo Transtornos de Ansiedade, patologias incapacitantes que geram impactos nas esferas sociais e financeiras. O estudo da microbiota intestinal mostrou uma relação intrínseca com o Sistema Nervoso Central (SNC) onde modificações neste sistema alteram a microbiota e o contrário também é verdadeiro, impactando também no TDM. Desta forma o presente estudo visa averiguar o impacto da modulação da população de *Lactobacillus* sp. da microbiota intestinal em modelo animal do TDM e ansiedade, avaliando assim o eixo cérebro-intestino. O projeto de pesquisa foi aprovado pela CEUA/UFPB (n. 5467061021). Foram usados camundongos (*Mus musculus*) Swiss, fêmeas (2-3 meses). Inicialmente os animais foram induzidos a desenvolverem o comportamento tipo depressivo e ansioso por meio da administração de dexametasona DEXA (20µg/kg) e solução ATB, composta por Vancomicina (0,5 g/L), Ampicilina (1 g/L), Norflaxacino (1 g/L) e Nistatina (100.00 UI) (*ad libitum*). Os grupos foram divididos: Salina, Plantarum, Dexa, Dexa+PL, ATB, ATB+PL. Foram realizados os seguintes testes comportamentais: Teste do campo aberto, teste de suspensão da cauda e teste do labirinto em cruz elevada. Além da checagem da fase do ciclo estral e a análise microbiológica de quantificação da população fecal de *Lactobacillus* sp. Os resultados mostram que ambos os protocolos, DEXA e ATB, conseguiram induzir comportamento do tipo depressivo, assim como comportamento do tipo ansioso, além de causarem significativa diminuição da população fecal de *Lactobacillus* sp. A administração de 200 µL da solução probiótica contendo o *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC003, na concentração de 10⁹ UFC/mL, conseguiu reverter o estado depressivo e ansioso, assim como a população *Lactobacillus* sp. da microbiota intestinal. O tratamento com a solução probiótica de *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC003 reverteu esse comportamento.

Palavras-chaves: *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC003; Dexametasona; *Lactobacillus* sp.; Microbiota intestinal.

LIMA, Kaíque Yago Gervazio de. Supplementation with *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC003 reverses depressive and anxiety-like behavior in a murine model. João Pessoa, 2023. Masters' dissertation (Masters in Biotechnology) – Universidade Federal da Paraíba, 2023

ABSTRACT

More than seven million Brazilians are affected by Major Depressive Disorder (MDD) and anxiety disorder, disabling pathologies that generate impacts in the social and financial spheres. The study of the intestinal microbiota showed an intrinsic relationship with the Central Nervous System (CNS) where changes in this system alter the microbiota and the opposite is also true, also impacting TDM. Thus, the present study aims to investigate the impact of the modulation of the population of *Lactobacillus* sp. of the gut microbiota in an animal model of MDD and anxiety, thus evaluating the gut-brain axis. The research project was approved by CEUA/UFPB (# 5467061021). Female Swiss (*Mus musculus*) mice (2-3 months) were used. Initially, the animals were induced to develop depressive and anxious behavior through the administration of dexamethasone DEXA (20µg/kg) and ATB solution, composed of Vancomycin (0.5 g/L), Ampicillin (1 g/L), Norflaxacin (1 g/L) and Nystatin (100.00 IU) (ad libitum). The groups were divided: Salina, Plantarum, Dexa, Dexa+PL, ATB, ATB+PL. The following behavioral tests were performed: Open field test, tail suspension test and elevated plus maze test. In addition to checking the estrous cycle phase and microbiological analysis to quantify the fecal population of *Lactobacillus* sp. The results show that both protocols, DEXA and ATB, managed to induce depressive-like behavior, as well as anxious-like behavior, in addition to causing a significant decrease in the fecal population of *Lactobacillus* sp. The administration of 200 µL of probiotic solution containing *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC003, at a concentration of 10⁹ CFU/mL, managed to reverse the depressive and anxious state, as well as the *Lactobacillus* sp. of the intestinal microbiota. Treatment with the probiotic solution of *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC003 reversed this behavior.

Keywords: *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC003; Dexamethasone; *Lactobacillus* sp.; Gut Microbiota.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Regulação pré-sináptica de neurônios serotoninérgicos (A), noradrenérgicos (B) e dopaminérgicos (C).....	12
Figura 2 – Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal. Núcleos Paraventriculares Hipotalâmicos (PVN); Fator de Liberação da Corticotrofina (CRF); Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH).....	14
Figura 3 – Relação entre atividade das citocinas pró-inflamatórias e eixo HPA. Cortisol (CORT); hormônio liberador de corticotrofina (CRH).....	15
Figura 4 – (A) Nichos da microbiota gastrointestinal, organização espacial de populações (B) Conjunto de fatores responsáveis por alterações da população na microbiota.....	16
Figura 5 – Linha de procedimento experimental.....	23
Figura 6 – Evolução ponderal do peso dos animais durante os 14 dias de experimentação.....	29
Figura 7 – Peso das estruturas cerebrais durante após 14 dias de experimentação	30
Figura 8 – Leitura das fases do ciclo estral	31
Figura 9 – Teste do campo aberto	32
Figura 10 – Teste de suspensão da cauda	33
Figura 11 – Teste do labirinto em cruz elevada	34
Figura 12 – Quantificação da população de Lactobacillus sp.....	36

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Populações microbianas mais afetadas na microbiota intestinal em vários modelos de estresse.....	17
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1 TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR	10
2.2 PRINCÍPIOS DA FISIOPATOLOGIA DA DEPRESSÃO	11
2.3 MICROBIOTA RESIDENTE INTESTINAL E RELAÇÃO COM DEPRESSÃO	15
2.4 LACTOBACILOS	19
2.5 MODELOS ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO DA DEPRESSÃO	20
3. OBJETIVOS	22
3.1. OBJETIVO GERAL	22
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 LOCAL DE ESTUDO	23
4.2. ANIMAIS	23
4.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS	24
4.4. <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	26
4.5 DROGAS E SOLUÇÃO PROBIÓTICA	23
4.5.1 Drogas para indução do comportamento depressivo	23
4.5.1.1 <i>Administração repetida de dexametasona</i>	23
4.5.1.2 <i>Tratamento ATB</i>	24
4.5.2 Solução probiótica	24
4.6 AVALIAÇÃO DO CICLO ESTRAL	26
4.7 AVALIAÇÃO GERAL DA ATIVIDADE NO SNC	26
4.7.1 Teste do Campo Aberto	26
4.8 AVALIAÇÃO DO ESTADO TIPO DEPRESSIVO	27
4.8.1 Teste de Suspensão da Cauda	27

4.9 AVALIAÇÃO DO ESTADO ANSIOSO.....	27
4.9.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	27
4.10 AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL.....	28
4.10.1 Quantificação de lactobacilos totais	28
4.10.2. Conversão de absorbância para UFC/g de amostra.....	28
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1 AVALIAÇÃO GERAL DOS ANIMAIS	30
5.1.1 Avaliação da evolução ponderal do animal	30
5.1.2 Avaliação do peso das estruturas cerebrais	31
5.1.3 Leitura das fases do ciclo estral	31
5.2 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	33
5.2.1 Teste do Campo Aberto	33
5.2.2 Teste da Suspensão da Cauda.....	34
5.2.3 Teste do Labirinto em Cruz Elevada.....	35
5.6 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	36
5.6.1 Quantificação da população de <i>Lactobacillus</i> sp.....	36
6. DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS.....	44

1. INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Global de Avaliação e Métricas de Saúde (2019), a depressão é considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma das doenças mais incapacitantes no mundo. Centenas de milhões de pessoas são afetadas pela doença, seja caracterizada por casos graves ou por casos menos severos, que podem perdurar alguns anos e levam o portador do transtorno a atentar à saúde, como, por exemplo, o suicídio; sendo a terceira maior causa de mortes entre pessoas de 15 a 29 anos (IHME, 2019).

Com uma epidemiologia tão vasta, supõe-se que a depressão se trata de um transtorno que não difere suas vítimas seja por idade ou gênero, seja por sexo ou etnia, contudo, já se sabe que a doença possui caráter multifatorial, isto é, uma junção de vários fatores intrínsecos e extrínsecos que levam o indivíduo ao comportamento depressivo. A literatura reporta que as mulheres são duas vezes mais acometidas pela depressão do que os homens, supondo-se que esse fato se deva aos impactos hormonais e a jornada de trabalho dupla que cumprem no trabalho e em suas residências (ALBERT, 2015).

O estudo de Stopa *et al.* (2015) mostrou a correlação entre a baixa qualidade de vida e o alto índice de depressão, em função do estresse social pelo qual as camadas mais pobres são mais vulneráveis. Além disso, há também o menor acesso a serviços de saúde que consigam gerar um diagnóstico que comprove a existência do transtorno e trabalhe em seu tratamento ainda na fase inicial, somado ao preconceito associado a doença (STOPA *et al.*, 2015).

Para o estudo da fisiopatologia da depressão e seus possíveis tratamentos, foram criados protocolos para indução do comportamento depressivo. O mais utilizado é o Estresse Leve Crônico Imprevisível (UCMS, do inglês unpredictable chronic mild stress), proposto em 1982, e com duração de 5 a 8 semanas (MINEUR; BELZUNG; CRUSIO, 2006). Este protocolo sofreu algumas adaptações para possibilitar sua aplicação nos mais diversos laboratórios pelo mundo (MORETTI *et al.*, 2012). Desde então, foi adaptado e é possível realizá-lo com confiabilidade em 14 dias (CARNEIRO *et al.*, 2022). Outro modelo de estudo da depressão comumente utilizado é o de administração crônica ou subcrônica de dexametasona (WRÓBEL *et al.*, 2014), cuja rapidez ao simular o estresse no animal por meio da administração de um glicocorticoide permite avaliar diferentes parâmetros (SKUPIO *et al.*, 2015).

Recentemente, a microbiota residente no intestino foi associada ao processo depressivo, bem como foi comprovada a interação direta entre o intestino e o sistema nervoso central – SNC (FOSTER *et al.*, 2013). Há muitas lacunas no entendimento como ocorre a comunicação da microbiota com o SNC. As principais hipóteses supõem a liberação de metabólitos pela microbiota, tais como ácido láctico. Outra hipótese indica que a interação ocorre pelo intermédio do sistema imunológico e o comportamento da microbiota resulta a liberação de citocinas pró-inflamatórias ou imunoreguladoras (KELLY *et al.*, 2015), visto que foi observado quanto maior o perfil inflamatório do indivíduo, maior é seu caráter depressivo e ansioso (FOSTER *et al.*, 2016; ORG *et al.*, 2016; MARIN *et al.*, 2017).

O presente trabalho visa avaliar a modulação de *Lactobacillus* spp. da microbiota intestinal de camundongos fêmeas, submetidos ao protocolo DEXA, com a administração repetida de dexametasona e o protocolo ATB onde foi disponibilizado *ad libitum* os seguintes antibióticos: Vancomicina, Ampicilina, Norflaxacino e Nistatina. Com o objetivo de indução do comportamento depressivo e ansioso, e sua posterior reversão com a suplementação da linhagem *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC003.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR

O transtorno depressivo maior, também chamado de Depressão Clínica, é uma desordem de humor severa, necessitando ser diagnosticada por especialista para evitar confundir-se com outros transtornos que acometem o SNC, tais como esclerose múltipla, doença de Parkinson, epilepsia, bem como condições hepáticas, hipotireoidismo ou hipertireoidismo (BENTLEY; PAGALILAUAN; SIMPSON, 2014; SOUZA, ALEXANDRE; GUIRARDELLO, 2017).

Segundo o Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V), a confirmação da patologia se dá unicamente por anamnese. O especialista avalia o paciente em 9 critérios ao longo de duas semanas corridas, a saber: (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014):

- 1- Humor depressivo na maior parte do dia, quase diariamente;
- 2- Diminuição ou perda do interesse ou prazer em todas ou quase todas as atividades do dia, quase diariamente;
- 3- Alterações do peso e/ou do apetite;
- 4- Hipersônia ou insônia;
- 5- Diminuição da atividade locomotora, observada pelos outros, não só subjetiva;
- 6- Fadiga ou sensação de perda de energia quase diariamente;
- 7- Sentimento de inutilidade ou culpa excessiva ou inapropriada quase diariamente;
- 8- Indecisão, diminuição da habilidade de pensar ou se concentrar ou raciocinar quase diariamente;
- 9- Pensamentos recorrentes de morte ou ideação suicida.

Para a confirmação do diagnóstico é necessária a presença de cinco ou mais dos sintomas acima citados, devendo pelo menos um deles serem obrigatoriamente os de número 1 ou 2 (BENTLEY; PAGALILAUAN; SIMPSON, 2014; SOUZA, ALEXANDRE; GUIRARDELLO, 2017). Em complemento, a ausência de marcadores bioquímicos específicos para o diagnóstico da depressão é uma problemática significativa, visto que muitos dos sintomas são corriqueiros e podem ser

experienciados pelos mais diversos motivos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

O transtorno depressivo e o transtorno ansioso frequentemente estão associados e compartilham muito a sua fisiopatologia, isto é a fisiopatologia de ambos os transtornos não é completamente elucidada. A presença do transtorno ansioso corrobora para detecção do TDM (MAGGIONI, *et. al.*, 2019).

Os dados apresentados pelo *Global Burden of Disease* (GBD) (2019) mostram um aumento de 57,8% da prevalência do TDM em mulheres em relação a homens e quando avaliamos ansiedade os dados exibem um aumento de 61,7%. Esses dados são um apanhado generalizado do diferente impacto desses transtornos na população feminina, em relação a masculina.

Albert (2015) sumariza diferentes trabalhos que abordam o maior impacto da depressão nas mulheres, cerca de duas vezes mais prevalente, e sugere possíveis causas para essa maior prevalência, entre elas estão as oscilações hormonais em diferentes fases do período fértil, pós partos, menopausa, jornada dupla entre trabalho e os afazeres do lar.

2.2 PRINCÍPIOS DA FISIOPATOLOGIA DA DEPRESSÃO

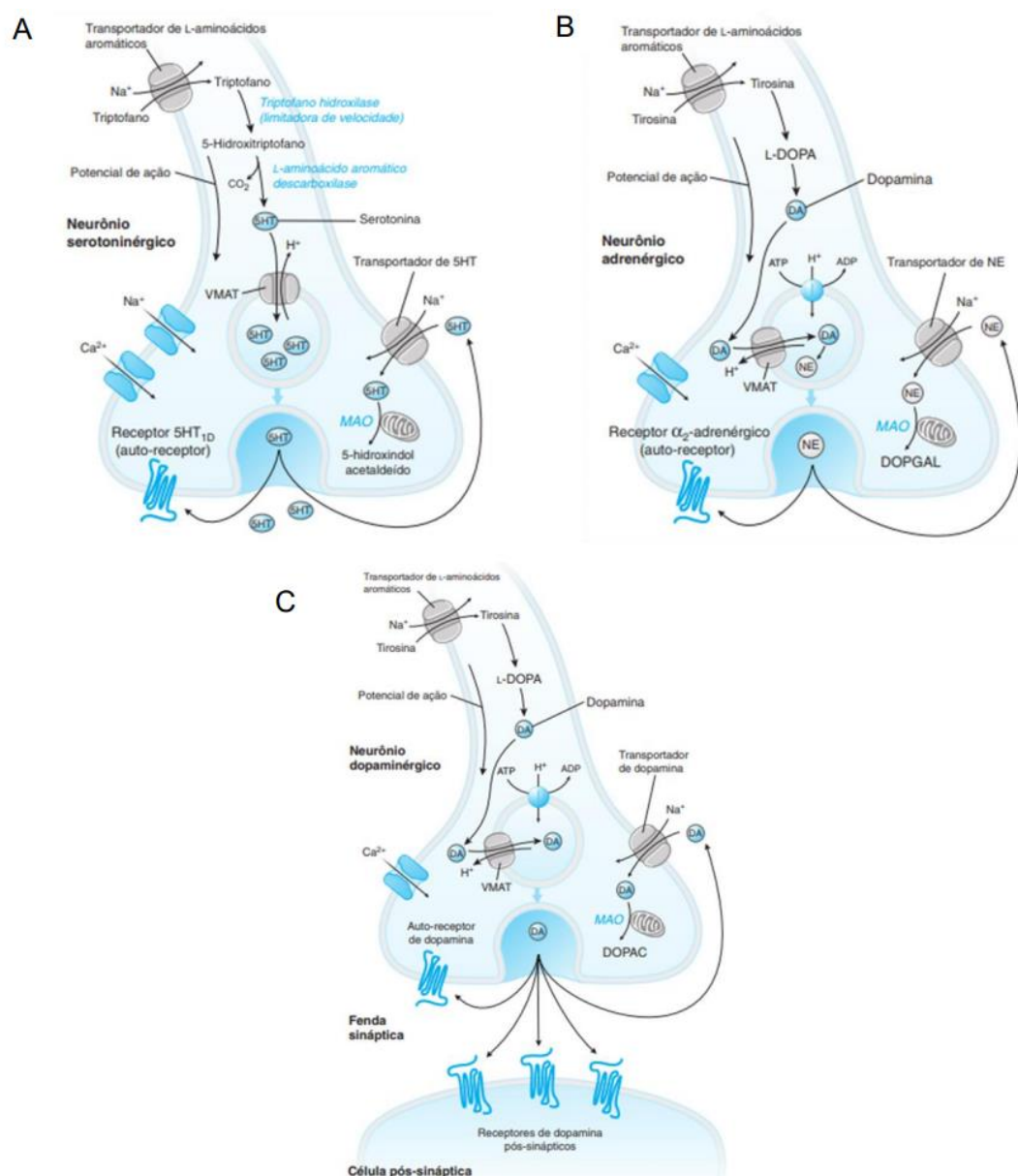
Com a fisiopatologia ainda não completamente elucidada, são reconhecidos três pilares que fundamentam a teoria de surgimento da depressão: I) a teoria das monoaminas; II) a teoria da desregulação do eixo Hipófise-Pituitária-Adrenal (HPA); e III) a teoria de neuroinflamação, todas amplamente debatidas na academia.

A teoria das monoaminas, a mais antiga, foi proposta por Schildkraut (1965) e aponta como causa da depressão a depleção de serotonina, noradrenalina e dopamina na fenda sináptica, em regiões específicas, como o hipocampo. Desta forma, o combate à depressão se dá na compensação da concentração de monoaminas na fenda sináptica, como ocorre no tratamento com inibidores da MAO (Monoamino Oxidase), que impedem sua degradação enzimática ou os inibidores da recaptação de serotonina e/ou noradrenalina (MULINARI, 2012). A Figura 1 resume este tipo de abordagem terapêutica, ainda muito difundida.

Em complemento, a teoria das monoaminas se fundamenta no fato de que vários neurônios serotoninérgicos possuem projeções que vão até o pró-encéfalo, tendo assim impacto na regulação do humor, da cognição e na regulação hormonal

(RICHELSON, 2001). Por muito tempo, a teoria das monoaminas foi a única tentativa de justificar o quadro depressivo. Seu mecanismo foi elucidado e acima de tudo era viável. Contudo, a problemática se dava justamente por isso, pois já se sabia que os medicamentos aumentavam a concentração dos neurotransmissores na fenda sináptica. Atualmente o tratamento farmacológico mantém essa linha e o período de latência para o efeito antidepressivo é idêntico, porém é importante sinalizar que os efeitos adversos não possuem período de latência, e isso dificulta a adesão ao tratamento (GOLD; MACHADO-VIEIRA; PAVLATOU, 2015).

Figura 1 – Regulação pré-sináptica de neurônios serotoninérgicos (A), noradrenérgicos (B) e dopaminérgicos (C).



Fonte: GOLAN *et al.* (2014).

A segunda teoria proposta para a depressão versa sobre a desregulação do eixo Hipófise-Pituitária-Adrenal (HPA). Para descrevê-la, inicialmente é necessário um breve comentário sobre estresse. O termo foi cunhado em 1956, como uma reação normal e fisiológica que pode ser dividido em três componentes: I) o estressor: a origem ao estresse, causador da desregulação da homeostase; II) estresse: o que o cérebro entende como a existência do estressor; e III) a resposta: como o cérebro vai reagir frente à situação fisiológica ou comportamental que originou o estresse (SELYE, 1973; MARGIS *et al.*, 2003).

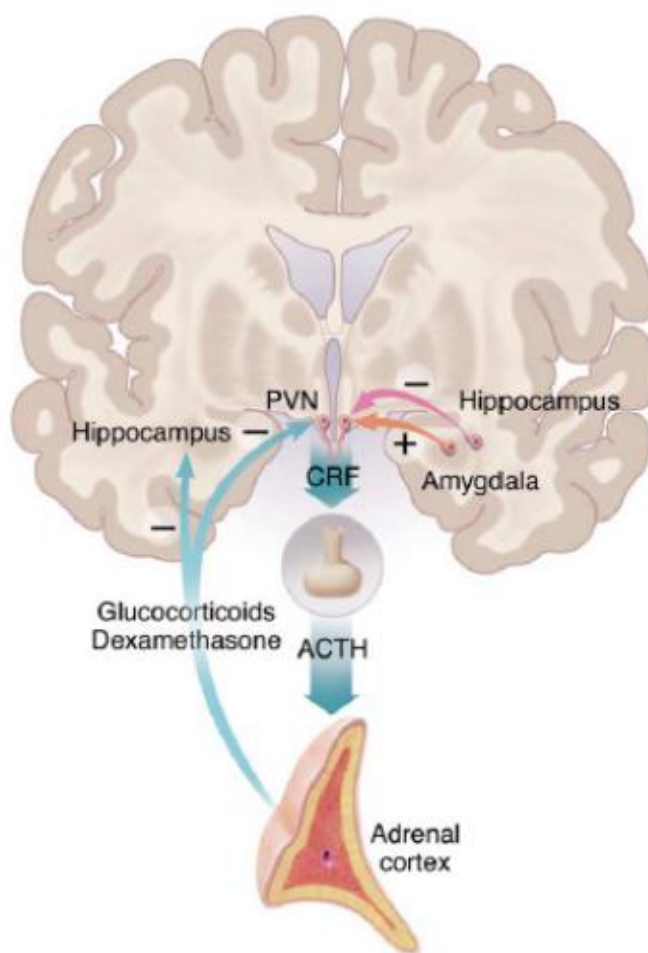
Assim, a resposta ao estresse é em que a teoria da desregulação do eixo HPA se baseia, visto que o organismo quando em situação de estresse geralmente recorre a respostas adaptativas (alostase). Quando o estresse ocorre de maneira aguda, de alta intensidade ou crônica, pode chegar a ser deletério a vários sistemas no corpo, como: cardiovascular, gastrointestinal, imunológico e até ao sistema nervoso central. Nesses casos mais graves, podendo até levar à morte, visto que pode atuar de maneira diferente em cada indivíduo (SIBA, 2013).

Os principais sistemas envolvidos na resposta ao estresse são o sistema nervoso autônomo simpático (SNAS) e o eixo HPA, que agem em conjunto pela secreção de catecolaminas e os glicocorticoides (GC), atuando em vias de retroalimentação negativa. Esses sistemas atuam focando o gasto energético corporal na solução da situação provocadora do estresse, por meio de aumento do débito cardíaco, assim como acelerando a respiração, aumentando reações de catabolismo e gerenciando o fluxo sanguíneo para os locais ameaçados, tudo isso focando nas reações de luta ou fuga (AGID; KOHN; LERER, 2000).

Já o eixo HPA atua de maneira diferente. O estímulo causado pelo estressor ativa as células dos núcleos paraventriculares hipotalâmicos, e promove a secreção do fator de liberação da corticotrofina (CRF) e vasopressina. O CRF é lançado na microcirculação hipofisária, assim podendo agir na pituitária, também chamada de hipófise anterior. A hipófise por sua vez libera o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na circulação sanguínea, ocasionando a produção de glicocorticoides no córtex da glândula adrenal, entre eles o cortisol em humanos, e corticosterona em roedores. Esses hormônios vão atuar na alça de retroalimentação negativa, diminuindo a produção da CRH e ACTH no hipocampo e hipotálamo (Figura 2) (NESTLER *et al.*, 2002).

O Cortisol ou corticosterona tem papel chave na regulação do eixo, visto que sua presença põe fim a cascata de sinalização, porém seus efeitos não estão restritos ao eixo HPA, sendo um importante hormônio para regulação do ritmo circadiano e do sistema imunológico (KELLER *et al.*, 2006; 2017; BOWERS *et al.*, 2008). A desregulação desse eixo está associada ao transtorno depressivo maior, pois os indivíduos acometidos pela doença possuem uma maior concentração de cortisol sérico circulante (KELLER *et al.*, 2017).

Figura 2 - Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal. Núcleos Paraventriculares Hipotalâmicos (PVN); Fator de Liberação da Corticotrofina (CRF); Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH).



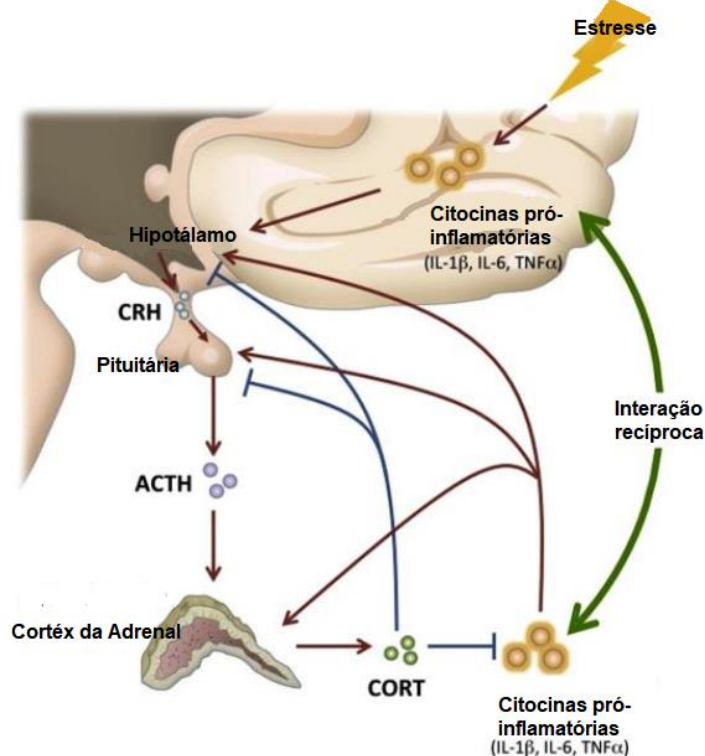
Fonte: NESTLER *et al.* (2012).

A terceira e mais recente teoria envolve a neuroinflamação. Ela está fundamentada no aumento sérico de citocinas pró-inflamatórias, tal como interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em pacientes com transtorno

depressivo maior (KARLOVIC *et al.*, 2012). A associação entre citocinas pró-inflamatórias e depressão surgiu pela associação da inflamação ao *sickness behavior* (comportamento de doença), ao qual possui muita sobreposição com a sintomatologia da depressão, como a presença de anedonia, fadiga e alterações de peso (HASLER, 2010).

Essa relação ficou ainda mais evidente quando se demonstrou que o uso de medicamentos anti-inflamatórios permitiu a melhora significativa no comportamento de doença e também restaurou o nível basal das monoaminas nos pacientes (LI *et al.*, 2021). Assim, Iwata, Ota e Duman (2013) propõem que ocorre uma relação muito mais intrínseca entre inflamação e depressão, visto que agem nos mesmos sistemas de sinalização, não apenas em escala comportamental, como também em escala fisiológica (Figura 3) (MILLER; MALETIC; RAISON, 2009).

Figura 3 - Relação entre atividade das citocinas pró-inflamatórias e eixo HPA. Cortisol (CORT); hormônio liberador de corticotrofina (CRH)



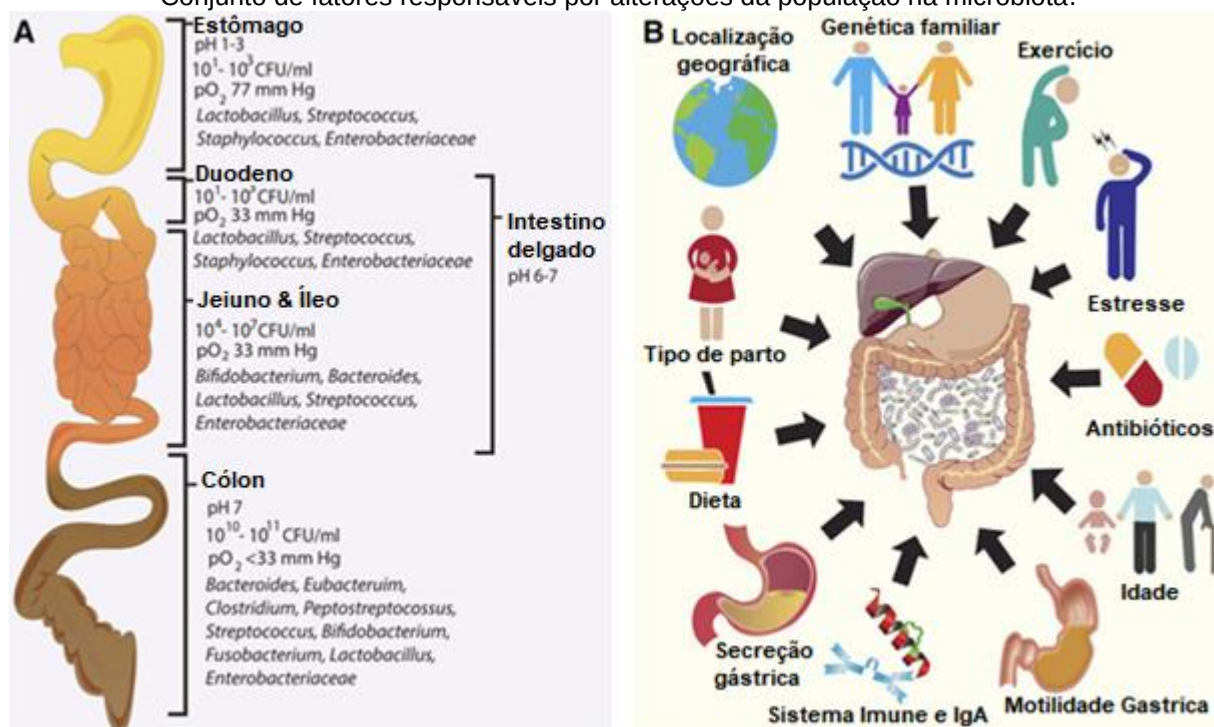
Fonte: IWATA *et al.* (2013).

2.3 MICROBIOTA RESIDENTE INTESTINAL E RELAÇÃO COM DEPRESSÃO

Para cada célula eucariota no corpo humano, existem 10 células procarióticas. Esta proporção espantosa se deve pelos diversos microecossistemas presentes no organismo, como por exemplo, mucosas, pele, cavidade oral e trato intestinal, onde a proporção pode chegar até 1:100 (KIM; JAZWINSKI, 2018). Desde o início do período pós-natal, mamíferos são colonizados por bactérias comensais, importantes no desenvolvimento imunológico, bem como para o processamento de nutrientes e outros aspectos da homeostase, ainda não totalmente elucidadas (KIM; JAZWINSKI, 2018). A microbiota residente intestinal é diversa e possui densidade alta. Abordagens moleculares e metataxonômicas identificaram mais de 1.000 espécies distintas de bactérias, com prevalência dos filos Firmicutes e Bacteriodes, compondo mais de 70% da população. Os demais microrganismos são representados por Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria e Verrucomicrobia (JOVEL *et al.*, 2016).

É importante ressaltar que a variabilidade da dinâmica da população destes microrganismos ocorre em função de diversos aspectos e hábitos no estilo de vida, tais como, alimentação, exercício, ingestão de bebidas alcoólicas ou estado fisiológico. Na Figura 4 são mostradas as divisões do sistema gastrointestinal e as suas populações microbianas residentes (A) e fatores responsáveis por alterações na microbiota (B). Ressalta-se que os microrganismos não estão divididos de maneira uniforme pelo sistema, podendo ocorrer nichos com mais ou menos populações (GRAF *et al.*, 2015).

Figura 4 – (A) Nichos da microbiota gastrointestinal, organização espacial de populações. (B) Conjunto de fatores responsáveis por alterações da população na microbiota.



Fonte: adaptado de CLARKE et al. (2019).

O impacto do estresse na saúde psicológica do indivíduo e seu papel como gatilho para o transtorno depressivo maior é conhecido. Acredita-se que a alteração da população da microbiota intestinal também confere um importante fator. Isto encoraja investigações da ligação Estresse-Depressão-Microbiota. O Quadro 1 sumariza as populações mais afetadas pelos protocolos de indução da depressão.

Quadro 1 - Populações microbianas mais afetadas na microbiota intestinal em vários modelos de estresse

Alteração da Microbiota intestinal	Modelo de estresse
↓ <i>Lactobacillus</i>	Estresse materno
↓ <i>Bacteriodes</i>	
↑ <i>Clostridium</i>	
↑ <i>Clostridium</i>	Estresse fisiológico
↑ <i>Oscillibacter</i>	
↓ <i>Porphyromonadaceae</i>	Estresse fisiológico
↓ <i>Lactobacillus</i>	Estresse pré-natal
↑ <i>Oscillibacter</i>	
↑ <i>Anaerotruncus</i>	

↑ <i>Peptococcus</i>	
↓ <i>Bacteroides</i>	Estresse social
↑ <i>Clostridium</i>	
↓ <i>Lactobacillus</i>	
↑ <i>Clostridium</i>	Estresse fisiológico
↓ <i>Actinobacteria</i>	
↓ <i>Alphaproteobacteria</i>	
↓ <i>Bacteroides</i>	
↓ <i>Parabacteroides</i>	Modelo Humano
↓ <i>Oscillibacter</i>	
↑ <i>Clostridium</i>	
↑ <i>Megamonas</i>	
↑ <i>Parasutterella</i>	
↓ <i>Lactobacillus</i>	

Setas para cima indicam um aumento da população e as setas para baixo, a redução.

Fonte: Adaptado de MOLINA-TORRES *et al.* (2019); CHEUNG *et al.* (2019).

Segundo Kelly *et al.* (2015), indivíduos acometidos por doenças do SNC, tais como: depressão, ansiedade e disfunções cognitivas, possuem um aumento característico da permeabilidade da barreira intestinal. Isso ocorre pela quebra das *Tight junctions* (traduzido como junções de oclusão), complexo proteico com a função de unir as células adjacentes para formação de membranas. O aumento dessa permeabilidade é responsável pelo extravasamento de microrganismos provenientes do intestino para a circulação, causando uma resposta imune que influencia fortemente a população da microbiota intestinal (CHOPYK; GRAKOU, 2020).

O impacto da microbiota sobre o comportamento pode ser observado quando, na ausência da mesma, animais desenvolvem comportamento ansioso símile, levando à premissa de que a presença de alguma microbiota específica intestinal pode agir como fator supressor de ansiedade e depressão (CRUMHEYROLLE-ARIAS *et al.*, 2014).

O quadro 1 mostra que entre as populações que sofrem alteração no comportamento depressivo a que mais se repete são os *Lactobacillus* mostrando assim um grau de importância do gênero no estudo do TDM. Marin e colaboradores (2017) comprovou o impacto do gênero na patologia assim como mostrou que se trata de uma via de mão dupla, onde alterações no SNC impactam na população de *Lactobacillus* e alterações na população de *Lactobacillus* impactam no SNC.

2.4 LACTOBACILOS

Lactobacilos são bactérias não esporulantes, Gram-positivas, do filo Bacillota, compreendendo mais de 170 espécies e 17 subespécies (GOLDSTEIN, TYRRELL; CITRON, 2015). Geralmente possuem formato cilíndrico, medindo 0.5-0.8 x 2.0-9.0 mm. Além disso, são bactérias facultativas ou aeróbias, acidófilas e fermentadoras. O ácido láctico é o principal produto da fermentação. Em condições laboratoriais são bactérias fastidiosas, requerendo nutrientes essenciais complexos (HAMMES; VOGEL, 1995).

De acordo com Marin *et al.* (2017) e Molina-Torres *et al.* (2019), os lactobacilos são fortemente afetados pelos protocolos de estresse. O grupo mostra vantagens como padrão para estudo porque para seu isolamento pode ser empregado o meio de cultura seletivo MRS (Man, Rogosa e Sharpe), o que facilita a metodologia de contagem, mesmo que sejam bactérias fastidiosas.

Lactobacillus sp. é reconhecido por sua funcionalidade. Por se tratar de um grupo amplamente utilizado como probiótico, lactobacilos são incorporados numa gama de produtos, por exemplo: iogurtes, fermentados de leite e queijos. Para garantir sua função como probiótico, a concentração no produto a ser ingerido deve ser de 10^6 UFC/g (SHAH, 2000).

O *Lactiplantibacillus plantarum* é uma espécie interessante para a academia, visto que já é um microrganismo encontrado facilmente no leite de cabra, de consumo diário, além de conseguir sobreviver às condições do trato gastrointestinal, colonizando o intestino e trazendo benefícios a saúde (ZAGO *et al.*, 2011).

O estudo de Lavilla-Lerma *et al.* (2013) avaliou várias linhagens de *L. plantarum* que apresentaram muitas características funcionais, e benefícios a saúde como: proteção contra câncer de cólon, arteriosclerose, degeneração de tecido neural e doença cardíaca coronária. Foi também avaliado a sobrevivência ao trato gastrointestinal e produção de substâncias antimicrobianas como bacteriocinas, que podem atuar protegendo o hospedeiro contra patógenos. É importante ressaltar que a população dos lactobacilos intestinais é facilmente alterada, podendo ser reduzida com administração de antibióticos ou suplementada pela introdução de probióticos (WILLIAMS, 2010; ZHAO *et al.*, 2020).

2.5 MODELOS ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO DA DEPRESSÃO

Embora seja laborioso reproduzir os comportamentos e alterações fisiológicas características da depressão humana em animais experimentais (DUMAN, 2010), os modelos animais são importantes ferramentas para o estudo geral da fisiopatologia ou tratamento da depressão (OVERSTREET, 2012). A literatura mostra que a administração de corticoides em camundongos ativa genes relacionados ao estresse e desta forma induzem comportamento depressivo similar, que pode ser revertido com administração de fármacos antidepressivos (WRÓBEL, 2014; SKUPIO, 2015). A aplicação de corticosterona ou corticoide sintético é um modelo válido para o estudo da fisiopatologia da depressão cuja eficácia foi demonstrada em diferentes abordagens experimentais bioquímicas e comportamentais (STERNER; KALYNCHUK, 2010).

Na academia é visto uma preferência ao uso de animais machos como modelos de depressão e ansiedade, porém já é comprovado uma maior prevalência desses transtornos em mulheres, desta forma se faz necessário uma atenção especial e a escolha de animais modelos do sexo mais afetado pela patologia (SLAVICH; SACHER, 2019; CARNEIRO *et al.*, 2022).

A dificuldade do uso de fêmeas em pesquisas comportamentais se dá principalmente pelo impacto do ciclo estral, ciclo reprodutor do animal, que se separa em 4 fases, são elas: Proestro, estro, metestro, diestro. As diferentes fases possuem diferentes impactos no comportamento animal variando também de acordo com a linhagem usada (MEZIANE *et al.*, 2006)

O modelo ATB, é uma adaptação do protocolo ABX de Zhao *et al.* (2020) usado para eliminar a microbiota normal de camundongos como um pré-tratamento para uma transplantação fecal. A alteração entre o modelo de Zhao e deste trabalho é a seleção dos antibióticos que compõem a solução. O modelo ATB utiliza-se do fato dessas substâncias impactarem a microbiota intestinal e consequentemente, demonstrar alto potencial de modulação comportamental (ZHAO, 2020).

A relação do efeito de antibióticos sobre o comportamento foi reportada em um pouco mais de uma década. Em 2010, foi descrito o primeiro relato de depressão induzida por antibióticos. O paciente era um homem de 75 anos, que cometeu suicídio enquanto realizava um tratamento com Levofloxacin, Trimetoprima e Sulfametoxazol, mais tarde identificados como antibióticos que podem causar depressão em alguns

casos (LASALVIA, DOMEK; GITLIN, 2010). Investigações posteriores contribuíram para solidificar a relação entre antibiótico e depressão, dentre eles, o uso de antibióticos e a depressão pós-parto, porém os resultados foram inconclusivos, encorajando mais investigações (MURPHY, 2018).

A justificativa do trabalho se dá pelo estudo da fisiopatologia da depressão e ansiedade, assim como averiguar o impacto da microbiota no transtorno depressivo e fundamentar novas metodologias de indução do comportamento depressivo/ansioso e por fim comprovar o uso da suplementação de *Lactiplantibacillus Plantarum* CNPC003 como alternativa de tratamento aos transtornos estudados.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a modulação de *Lactobacillus* spp. da microbiota intestinal de camundongos fêmeas, submetidos a protocolos de indução do comportamento depressivo e ansioso.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Induzir o comportamento do tipo depressivo e ansioso com o protocolo DEXA em camundongos fêmeas;
- Provocar o comportamento do tipo depressivo e ansioso com o protocolo ATB em camundongos fêmeas;
- Avaliar os impactos do protocolo DEXA e ATB na população intestinal de *Lactobacillus* sp. de camundongos fêmeas;
- Analisar o comportamento tipo depressivo por meio dos testes comportamentais suspensão da cauda e campo aberto, em camundongos fêmeas sujeitas aos protocolos DEXA e ATB;
- Avaliar o comportamento tipo ansioso por meio dos testes comportamentais labirinto em cruz elevada e campo aberto, em camundongos fêmeas sujeitas aos protocolos DEXA e ATB;
- Verificar a reversão do comportamento depressivo e/ou ansioso por meio da administração de *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC003.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE ESTUDO

Os experimentos comportamentais foram realizados no Laboratório de Psicofarmacologia (Psifarm) localizado Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) e os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA) localizado no centro de Biotecnologia (CBIOTEC), ambos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) Swiss fêmeas, em torno de dois meses de vida, com peso entre 20-30 g, oriundos do Biotério do Labetox, pertencente ao Instituto de Pesquisa de Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), localizado na Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações da Lei nº 11.794 de 08/10/2009 e devidamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba, sob número de protocolo 5467061021 (APÊNDICE A).

Todos os animais foram alojados em ambiente com temperatura controlada ($21\pm1^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais foram instalados em gaiolas de polietileno, de forma randômica, com limite de 5 animais por caixa, recebendo água e ração livremente durante todo o experimento e na primeira metade do experimento os animais do Grupo ATB e ATB+PL (vide item 4.3.1.2), tiveram sua água trocada pela solução ATB.

4.3 DROGAS E SOLUÇÃO PROBIÓTICA

4.3.1 Drogas para indução do comportamento depressivo

4.3.1.1 Administração repetida de dexametasona

Dexametasona (Achê, Decadron) ($20\text{ }\mu\text{g/kg/dia}$, s.c.) foi solubilizada em solução salina (0,9% NaCl) e posteriormente armazenada a -10°C . O tempo de tratamento com a dexametasona foi de 14 dias, e os testes comportamentais, realizados duas horas após a última injeção (GERVAZIO, 2021).

4.3.1.2 Tratamento ATB

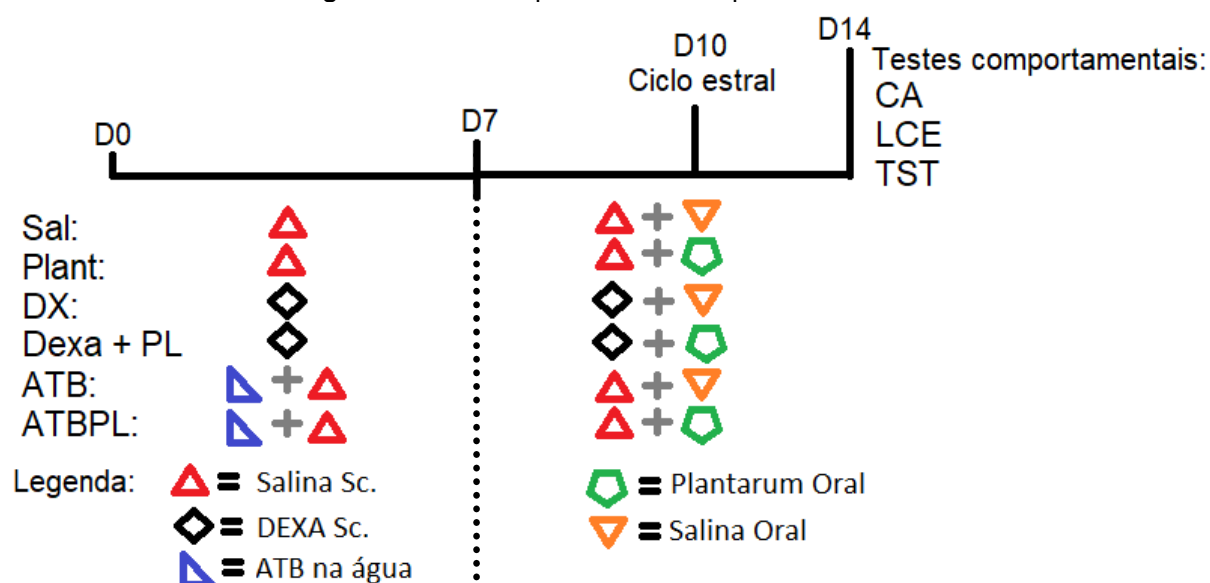
A solução ATB é um coquetel de antibióticos, composto por Vancomicina (0,5 g/L), Ampicilina (1 g/L), Norflaxacino (1 g/L) e Nistatina (100.00 UI), dissolvidos na água ofertada aos animais *ad libitum* por 24 horas, diariamente, durante todos os dias do protocolo (adaptado de ZHAO, 2020).

4.3.2 Solução probiótica

A solução probiótica contendo *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC003 foi revivida de uma cultura estoque liofilizada cedida pela EMBRAPA Caprinos e Ovinos, inoculada em meio MRS, e incubada em estufa bacteriológica a 37 °C por 48 horas. Em seguida, foi quantificada sua população pelo método de leitura da absorbância em 600 nm. Após verificado o crescimento, o inóculo foi submetido a centrifugação com velocidade de 6.000 RPM por 10 minutos, lavada com solução salina duas vezes e ressuspensão em solução salina de modo que a concentração final fosse de 10^9 UFC/mL. Após esse processo, a solução probiótica foi administrada aos animais no volume de 200uL via gavagem (LIAO *et al.*, 2020).

4.4. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Ao total foram utilizados 60 animais divididos nos 6 grupos abaixo, resultando em um **n** amostral de 10 animais por grupo. A linha de procedimento experimental abaixo sumariza os grupos assim como os principais eventos do trabalho. Todos os animais foram submetidos a manuseio de forma padronizada.

Figura 5 - Linha de procedimento experimental.

Fonte: Autoria própria. Legenda: D0= Início do experimento; D7=Sétimo dia de experimento, metade; D10=Décimo dia; D14=último dia de experimento

O sumário dos grupos está descrito a seguir:

- O controle negativo SAL (dez camundongos) recebeu, por via subcutânea (s.c.), apenas solução salina (0,9% m/v de cloreto de sódio) em uma concentração de 0,1 mL/kg de animal;
- O grupo Plant (PL) (dez camundongos) recebeu, por via subcutânea (s.c.), apenas solução salina (0,9% m/v de cloreto de sódio) em uma concentração de 0,1ml/kg de animal e nos últimos 7 dias recebeu 200 µL da solução probiótica, via gavagem, na concentração de 10^9 UFC/mL;
- O grupo DEXA (dez camundongos) recebeu a Dexametasona (Sigma-Aldrich, Brasil), dissolvida em solução salina e administrada em via subcutânea (s.c.) em uma concentração de 20 µg/kg;
- O grupo DEXA + Plant (PL) (dez camundongos) recebeu a Dexametasona (Sigma-Aldrich, Brasil), dissolvida em solução salina e administrada, via subcutânea (s.c.), em uma concentração de 20 µg/kg e, nos últimos 7 dias, recebeu 200 µL da solução probiótica, via gavagem, na concentração de 10^9 UFC/mL;
- O grupo ATB + Plant (PL) (dez camundongos) teve sua água substituída pela solução ATB, sendo essa a única fonte de água da gaiola pelos primeiros 7 dias de protocolo.

- O grupo ATB + Plant (PL) (dez camundongos) teve sua água substituída pela solução ATB, sendo essa a única fonte de água da gaiola pelos primeiros 7 dias de protocolo e nos últimos 7 dias recebeu 200 µL da solução probiótica, via gavagem, na concentração de 10^9 UFC/mL.

O tratamento com Dexametasona se iniciou no dia 1 do protocolo DEXA, já o tratamento dos dois grupos que receberam a solução probiótica contendo *L. plantarum* iniciou após sete dias e foi continuado até o último dia do protocolo de indução do comportamento depressivo.

4.5. *Lactiplantibacillus plantarum*

Foi utilizada a linhagem CNPC003 (anteriormente *Lactobacillus plantarum* B12, Patrimônio Genético: BRMCTAA179), foi isolada de leite caprino, da raça anglo nubiana e pertence a “Coleção de Microrganismos de Interesse para Indústria de Alimentos”, cedida pela Embrapa Caprinos e Ovinos (Sobral, Ceará, Brasil).

4.6 AVALIAÇÃO DO CICLO ESTRAL

O ciclo estral foi realizado conforme o protocolo descrito por Byers (2012). Foi coletado um lavado vaginal dos animais com solução salina a 0,9%, colorido com Azul de metileno, e em seguida levado para análise no microscópio. Com base no perfil da população celular do lavado e a aparência exterior da vagina, foram definidas as fases. (MCLEAN, 2012). Ao todo são 4 fases do ciclo estral essas são: Proestro, Metestro, Estro e Diestro. A depender da fase em que se encontra os animais podem haver alterações a resposta aos testes comportamentais, especificamente na comparação entre fase fértil, estro com as fases inférteis, Proestro, metestro, diestro. (MEZIANE, 2007)

4.7 AVALIAÇÃO GERAL DA ATIVIDADE NO SNC

4.7.1 Teste do Campo Aberto

Originalmente descrito por Hall em 1934, o Teste do Campo Aberto apesar de ser um modelo animal muito conhecido para ansiedade, não é um método específico, podendo ser aplicado como um teste geral, uma vez que o efeito de muitas drogas tem sido investigado no Campo Aberto, incluindo drogas ansiolíticas, estimulantes, sedativas ou drogas epileptogênicas (MINEUR; BELZUNG; CRUSIO, 2006).

O teste do campo aberto foi realizado para avaliar a atividade geral do SNC, em uma plataforma plana circular 40x40x60, com 12 quadrantes demarcados. Os animais foram alojados no centro do aparato após a filmagem ser iniciada e foi contado cinco minutos após o início do teste, tendo intenção de avaliar o caráter exploratório e a locomoção dos animais. Os parâmetros analisados foram: tempo total que os animais passam nos quadrantes centrais e número de *rearing* (levantamento) (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006).

4.8 AVALIAÇÃO DO ESTADO TIPO DEPRESSIVO

4.8.1 Teste de Suspensão da Cauda

O teste de suspensão da cauda foi realizado para detectar comportamento do tipo depressivo. Os animais foram colocados em uma situação de perigo inescapável, suspensos e presos com fita adesiva a cerca de 1 cm da ponta da cauda, numa plataforma 50 cm acima da bancada, por um período de cinco minutos. Neste experimento foram observados os seguintes parâmetros: latência e tempo de imobilidade. Os animais com maior tempo de imobilidade, ou seja, um menor tempo de luta contra a situação, se encaixam em um perfil depressivo (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005).

4.9 AVALIAÇÃO DO ESTADO ANSIOSO

4.9.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

O teste teve o objetivo de avaliar o comportamento tipo ansioso do animal proposto por PELLOW *et al.*, (1985) e adaptado posteriormente para camundongos por LISTER (1990). O aparato é composto por 4 braços erguidos em que 2 deles são abertos à entrada de luz e os 2 outros na obscuridade. Como os camundongos são

animais de hábitos noturnos, assim estão adaptados a ambientes escuros, contudo ao serem colocados no centro dos 4 braços passam por um estado de medo e ansiedade, podendo ser avaliado o estado do animal frente a essa situação pela qual pode se esquivar e/ou explorar. Os seguintes parâmetros foram observados por 5 minutos: tempo de permanência nos braços fechados; tempo de permanência nos braços abertos; número de entradas nos braços fechados; e número de entradas nos braços abertos. Entre cada animal a arena foi higienizada com solução hidroalcolica 10% (MORATO, 2006).

4.10 AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL

4.10.1 Quantificação de lactobacilos totais

Inicialmente foi realizada a coleta e pesagem de um bolo fecal de cada animal, apresentando peso médio de 30 mg. As amostras foram transferidas para 10 mL de solução salina de NaCl 0,85% e em seguida, diluídas 1:10 até a terceira diluição. Desta solução, 100 µL foram transferidos para tubos Falcon com capacidade para 15 mL, contendo 9,9 mL de caldo MRS, composto de (em mg/L): peptona de caseína 10, extrato de carne 8, extrato de levedura 4, D(+)-glicose 20, fosfato dipotássico 2, tween 80™ 1, citrato diamônio 2, acetato de sódio 5, sulfato de magnésio 0,2, sulfato de manganês 0,04 e pH ajustado para 5,5. A incubação foi realizada em jarros de anaerobiose, à 37°C por 48 horas.

Após o período de incubação, foi determinada a absorbância do meio a 600 nm em espectrofotômetro (Kasvi, K37-VIS), considerando para os cálculos a absorbância do caldo MRS não inoculado (AHN *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2012).

4.10.2. Conversão de absorbância para UFC/g de amostra

A população de *Lactobacillus* sp. foi verificada em três ocasiões: no início do experimento (D=0), com uma semana (D=7) e duas semanas (D=14).

Amostras de fezes foram igualmente tomadas e tratadas como descrito anteriormente, sendo que a quantificação ocorreu em ágar MRS pela técnica do *pour plate* (SILVA, 2018), a partir de treze diluições decimais. Uma alíquota de 1 mL foi distribuída em placas de Petri e 10 mL de ágar foi vertido a seguir. Após

homogeneizada, as placas foram deixadas em repouso e incubadas solidificadas em ambiente de anaerobiose à 37°C por 48 horas. Igualmente, amostras foram transferidas para caldo MRS como descrito anteriormente para determinação da absorbância a 600 nm. Passadas as horas, o número de colônias foi contado e uma curva-padrão foi determinada cuja equação obtida ($r = 0,9159$) foi empregada para quantificar a população de *Lactobacillus* spp. (KIM *et al.*, 2012).

A conversão da ABS_{600} para unidades formadoras de colônia por grama de fezes (UFC/g) foi realizada pelo cálculo:

$$y \text{ (UFC/g)} = [149368 \times ABS_{600} - 243511] \quad (\text{Eq. 1})$$

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados demonstrados neste trabalho são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Os dados foram primeiramente submetidos ao teste de Shapiro para avaliar a normalidade. Em seguida, foi feita a comparação dos grupos por meio do teste ANOVA, seja de uma via. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$. As análises foram realizadas pelo software Graphpad Prism®.

5. RESULTADOS

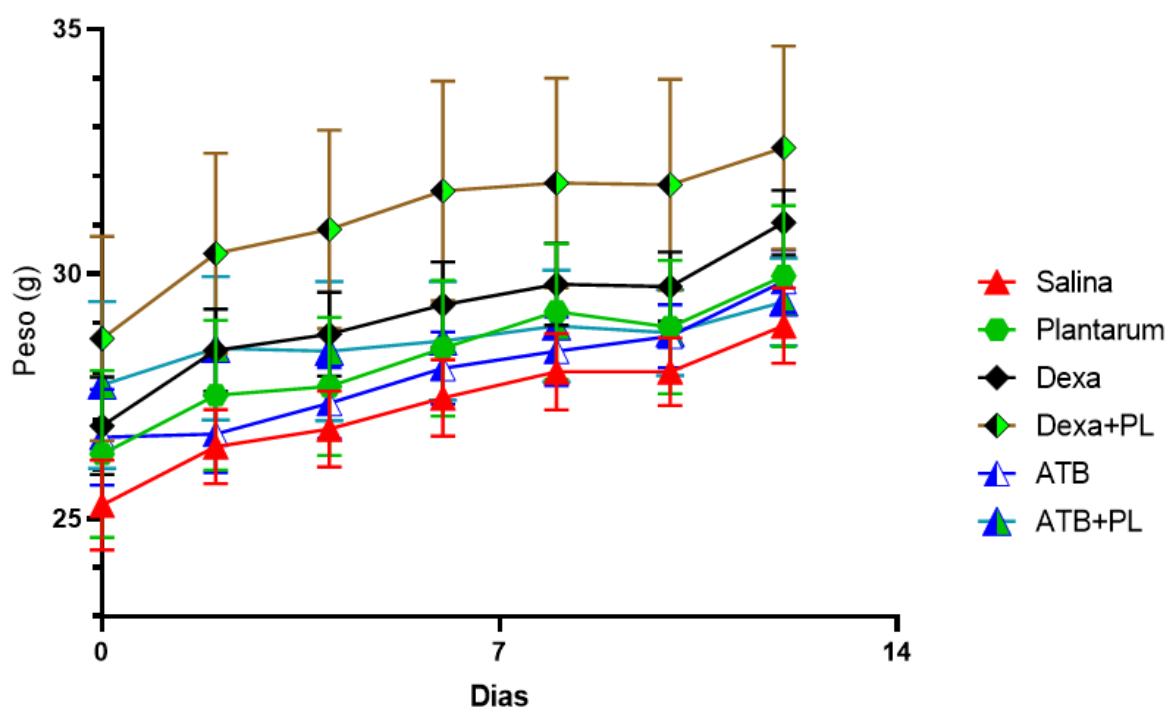
O processo de modulação da população de *Lactobacillus* sp. da microbiota pelos protocolos ATB e DEXA e a suplementação com o *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC003 foi analisado por meio da avaliação geral dos animais (peso ponderal, estruturas cerebrais e ciclo estral), somado aos testes comportamentais (campo aberto, teste de suspensão da cauda e labirinto em cruz elevado) e a análise microbiológica dos bolos fecais.

5.1 AVALIAÇÃO GERAL DOS ANIMAIS

5.1.1 Avaliação da evolução ponderal do animal

Na Figura 6 é possível observar o aumento de peso dos animais ao longo dos 14 dias de experimento, sem diferença estatística significativa entre os grupos. Sendo assim todos os animais apresentaram crescimento semelhante, sem influência do tratamento no ganho ou perda de peso.

Figura 6: Evolução ponderal do peso dos animais durante os 14 dias de experimentação.



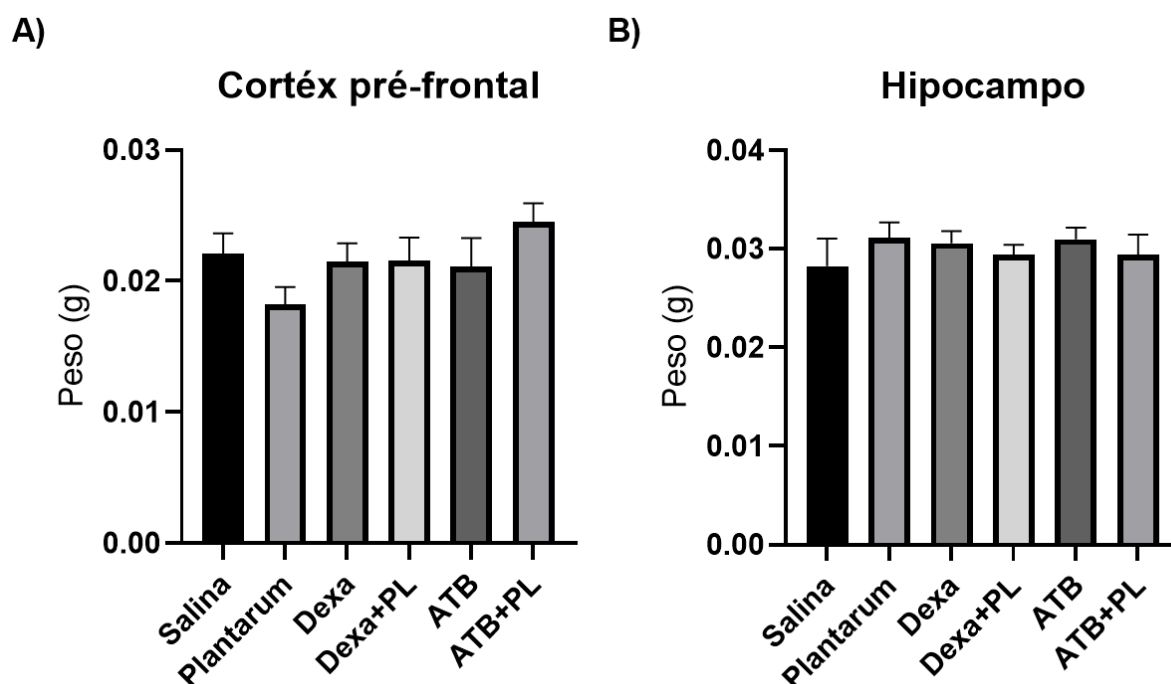
Legenda: Barras verticais mostram o desvio padrão da média. n=10 ANOVA "one way" seguido pelo teste post hoc Dunnett; Salina= grupo controle; Plantarum= grupo tratado com a solução probiótica; Dexa= grupo tratado com Dexametasona; Dexa + PL= Grupo tratado com Dexametasona e solução

probiótica; ATB= Grupo com acesso livre a solução ATB nos primeiros 7 dias de protocolo; ATB + PL= grupo com acesso livre a solução ATB nos primeiros 7 dias de protocolo e tratado com solução probiótica nos últimos 7 dias de protocolo.

5.1.2 Avaliação do peso das estruturas cerebrais

Foi avaliado o peso das estruturas cerebrais de interesse, para detectar a possível diminuição de seu volume, característica do dano tecidual causado pelo processo inflamatório do transtorno depressivo. Quanto ao peso do córtex pré-frontal e do hipocampo dos animais, não houve diferença estatística nos grupos avaliados, como visto na Figura 7.

Figura 7: Peso das estruturas cerebrais durante após 14 dias de experimentação (n=10)



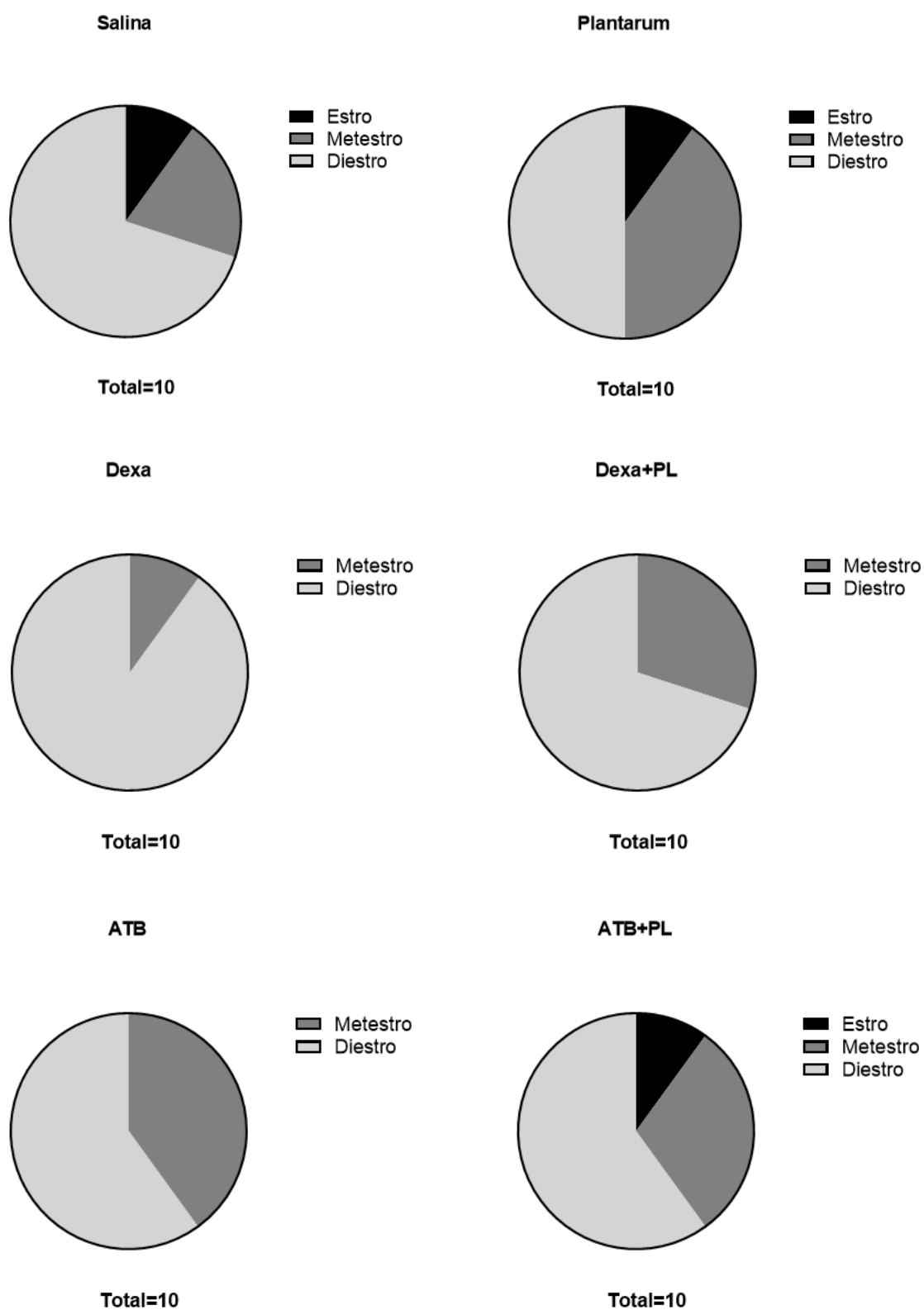
Legenda: Barras verticais mostram o desvio padrão da média. n=10. Diferença estatística por ANOVA "one way" seguido pelo teste post hoc Dunnett, em relação ao controle (Salina). Salina= grupo controle; Plantarum= grupo tratado com a solução probiótica; Dexa= grupo tratado com Dexametasona; Dexa + PL= Grupo tratado com Dexametasona e solução probiótica; ATB= Grupo com acesso livre a solução ATB nos primeiros 7 dias de protocolo; ATB + PL= grupo com acesso livre a solução ATB nos primeiros 7 dias de protocolo e tratado com solução probiótica nos últimos 7 dias de protocolo.

5.1.3 Leitura das fases do ciclo estral

A determinação da fase do ciclo estral foi utilizada para avaliar a fase do ciclo que os animais se encontravam. Contudo, não foram realizadas análises estatísticas, pois tratou-se de um teste qualitativo. Além disso, foi verificado que a maior parte dos

animais se encontrava na fase de diestro, seguida pelo metestro, como apresentado na Figura 8. Observou-se também presença da fase estro (fértil) no grupo controle e em dois grupos que receberam suplementação com o probiótico.

Figura 8: Leitura das fases do ciclo estral



Fases do ciclo estral: proestro, estro, metestro diestro

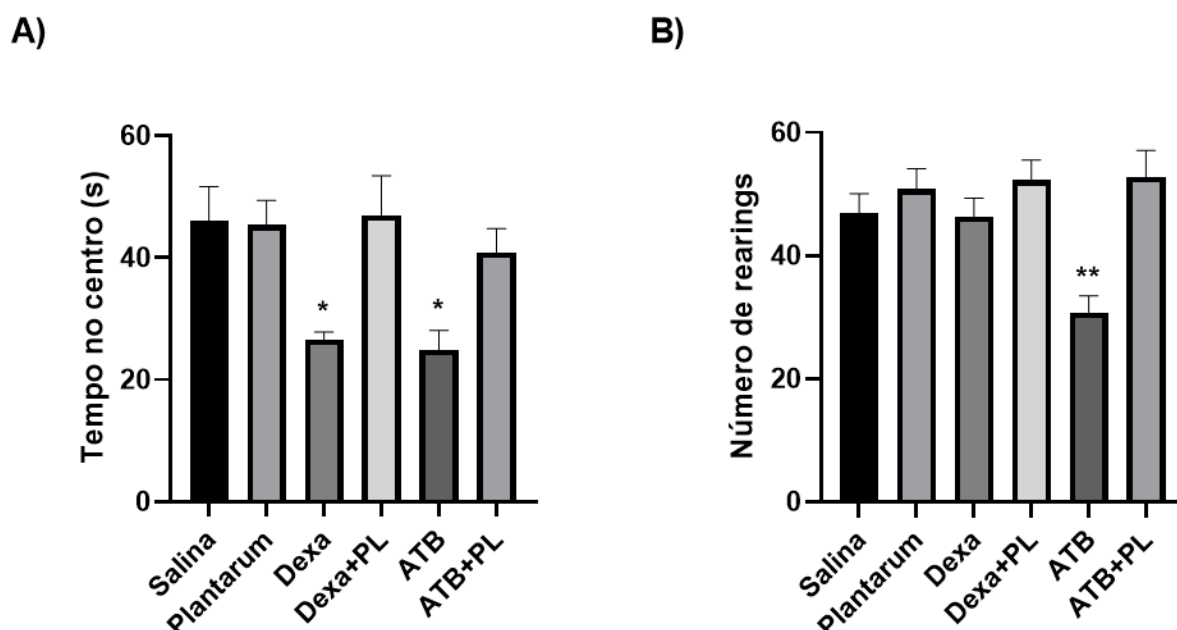
5.2 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

5.2.1 Teste do Campo Aberto

O campo aberto foi utilizado para avaliar o estado comportamental geral dos animais. A Figura 9 (A) apresenta o tempo total em que o animal permaneceu no centro do campo aberto. Tempo no centro é um parâmetro relativo ao comportamento do tipo ansioso de evitação, onde animais mais ansiosos evitam a região central, exposta, por um instinto de segurança advindo das regiões mais próximas as paredes do aparato. Nesse parâmetro, os grupos Dexa e ATB apresentaram diminuição significativa do tempo no centro quando comparados com o grupo Salina – controle (Salina vs. Dexa $p=0,0205$; Salina vs. ATB $p=0,0100$).

Quanto à análise do número de *rearings*, é verificado o comportamento de elevação, onde o animal apoiando-se apenas nas patas traseiras, com o objetivo de explorar o ambiente. O comportamento exploratório, no caso um maior número de *rearings*, é indicativo de animais menos ansioso. Na Figura 9 (B) verifica-se que o grupo ATB apresentou um número significativamente menor de *rearings* quando comparado com o grupo Salina (Salina vs. ATB $p=0,0067$).

Figura 9: Teste do campo aberto.



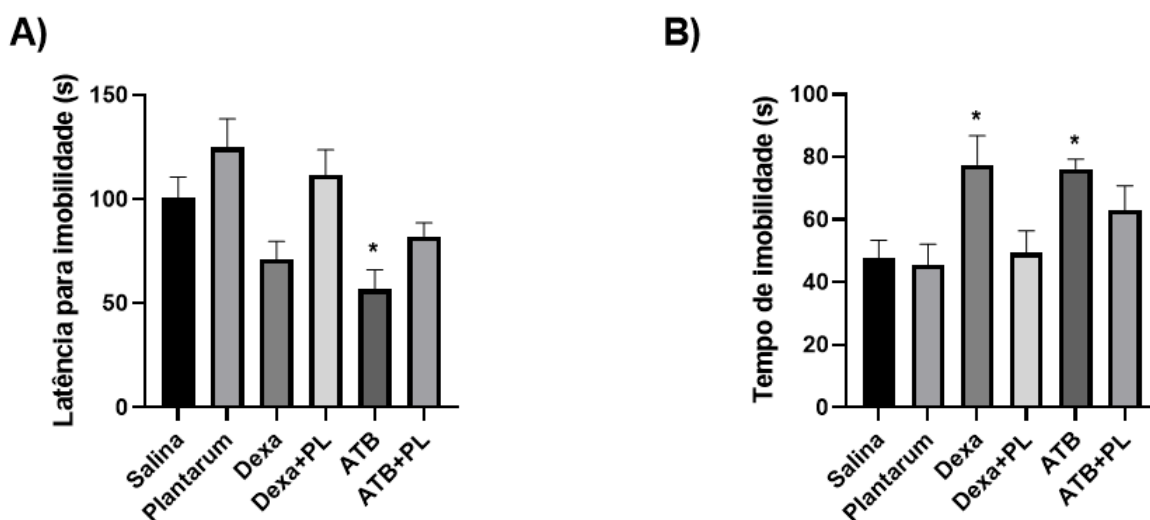
Legenda: Barras verticais mostram o desvio padrão da média. n=10. ANOVA “one way” seguido pelo teste post hoc Dunnett; * $p<0,05$ ** $p<0,001$ em relação ao controle Salina. Salina= grupo controle; Plantarum= grupo tratado com a solução probiótica; Dexa= grupo tratado com Dexametasona; Dexa + PL= Grupo tratado com Dexametasona e solução probiótica; ATB= Grupo com acesso livre a solução ATB nos primeiros 7 dias de protocolo; ATB + PL= grupo com acesso livre a solução ATB nos primeiros 7 dias de protocolo e tratado com solução probiótica nos últimos 7 dias de protocolo.

5.2.2 Teste da Suspensão da Cauda

O teste de suspensão da cauda foi utilizado a fim de avaliar comportamento do tipo depressivo. Os animais foram postos numa situação de perigo inescapável e foi avaliado o comportamento de luta, onde animais mais depressivos tendem a desistir mais rapidamente e por um maior período de tempo. Quanto ao resultado da latência, isto é, o tempo necessário para a primeira imobilidade, o grupo ATB apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo Salina (Salina vs. ATB $p=0,0197$), como mostra a Figura 10 (A).

Na Figura 10 (B) também é demonstrado o tempo de imobilidade dos animais, onde os grupos Dexa e ATB apresentaram um aumento significativo quando comparados ao grupo Salina (Salina vs. Dexa $p=0,0136$; Salina vs. ATB $p=0,0297$).

Figura 10: Teste de suspensão da cauda

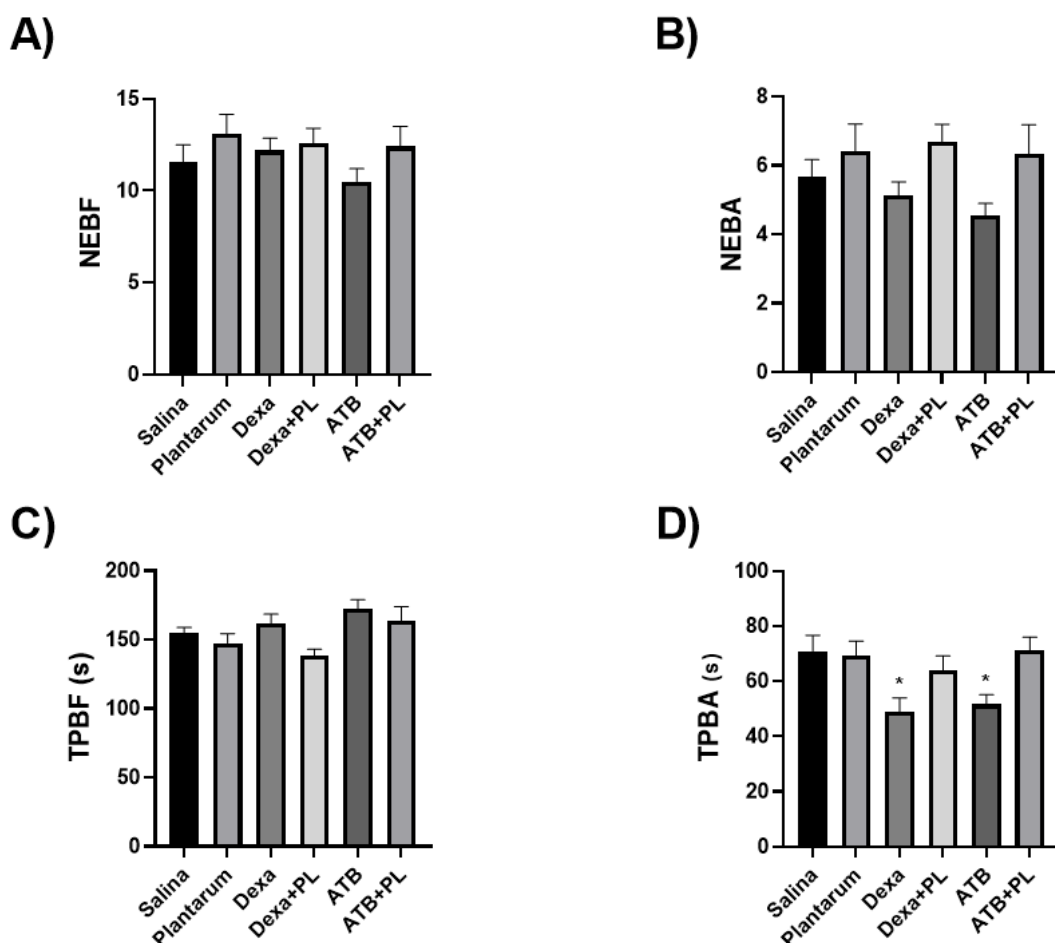


Legenda: Barras verticais mostram o desvio padrão da média. n=10. ANOVA “one way” seguido pelo teste post hoc Dunnett; * $p<0,05$ em relação ao controle Salina. Salina= grupo controle; Plantarum= grupo tratado com a solução probiótica; Dexa= grupo tratado com Dexametasona; Dexa + PL= Grupo tratado com Dexametasona e solução probiótica; ATB= Grupo com acesso livre a solução ATB nos primeiros 7 dias de protocolo; ATB + PL= grupo com acesso livre a solução ATB nos primeiros 7 dias de protocolo e tratado com solução probiótica nos últimos 7 dias de protocolo.

5.2.3 Teste do Labirinto em Cruz Elevada

O teste do labirinto em cruz elevada é utilizado para avaliar comportamento do tipo ansioso. Nele, os animais experimentais são postos no centro da estrutura com 4 braços postos em cruz sendo 2 braços abertos, sem paredes, e 2 braços fechados visando avaliar o comportamento de evitação natural do animal, onde animais mais ansiosos evitam as regiões mais abertas e expostas. No presente estudo, foram analisados o número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos e fechados, estando apresentados os resultados na Figura 11.

Figura 11: Teste do labirinto em cruz elevada



Barras verticais mostram o desvio padrão da média. n=10

Legenda: Barras verticais mostram o desvio padrão da média. n=10. ANOVA "one way" seguido pelo teste post hoc Dunnett; * $p < 0,05$ em relação ao controle Salina. Salina= grupo controle; Plantarum= grupo tratado com a solução probiótica; Dexa= grupo tratado com Dexametasona; Dexa + PL= Grupo tratado com Dexametasona e solução probiótica; ATB= Grupo com acesso livre a solução ATB nos primeiros 7 dias de protocolo; ATB + PL= grupo com acesso livre a solução ATB nos primeiros 7 dias de protocolo e tratado com solução probiótica nos últimos 7 dias de protocolo. NEBF= Número de entradas nos braços fechados; NEBA= Número de entradas nos braços abertos; TPBF= Tempo de permanência nos braços fechados; TPBA= Tempo de permanência nos braços abertos.

O tempo de permanência nos braços abertos (Fig. 11 – D) foi único parâmetro avaliado onde foi observada diferença estatística entre os grupos, tendo Dexa e ATB apresentado uma diminuição significativa no tempo de permanência quando comparados ao grupo controle Salina (Salina vs. Dexa $p=0,0146$; Salina vs. ATB $p=0,0314$).

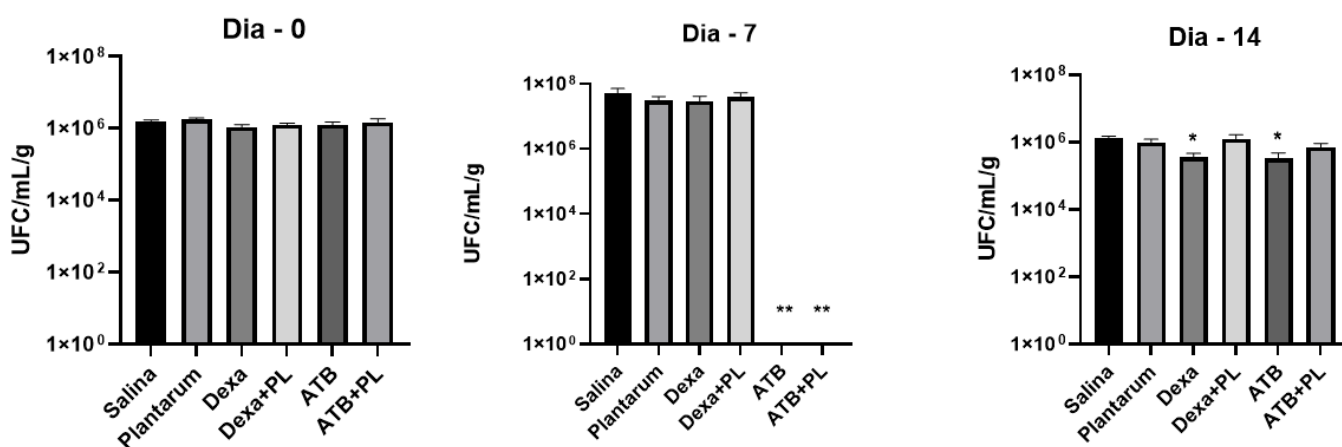
5.6 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

5.6.1 Quantificação da população de *Lactobacillus* sp.

Observou-se um aumento de dez vezes na população de *Lactobacillus* sp. até o D=7 e igual redução ao final do experimento (D=14). Foi verificada diferenças estatísticas na população bacteriana após uma e duas semanas de tratamento, nas diferentes condições testadas (Figura 12).

As alterações estatísticas mais significativas ocorreram em D=7, com uma drástica diminuição da população de *Lactobacillus* sp. nos grupos tratados com a solução ATB, quando comparados ao grupo Salina (Salina vs. ATB $p=0,0073$; Salina vs. ATB+PL $p=0,0073$). Já no tempo D=14, os grupos Dexa e ATB apresentaram diminuição estatística significativa também quando comparados ao grupo Salina (Salina vs. Dexa $p=0,0213$; Salina vs. ATB $p=0,0360$).

Figura 12: Quantificação da população de *Lactobacillus* sp.



Legenda: Barras verticais mostram o desvio padrão da média. $n=10$. ANOVA "one way" seguido pelo teste post hoc Dunnett; * $p<0,05$ ** $p<0,001$ em relação ao controle Salina. Salina= grupo controle; Plantarum= grupo tratado com a solução probiótica; Dexa= grupo tratado com Dexametasona; Dexa +

PL= Grupo tratado com Dexametasona e solução probiótica; ATB= Grupo com acesso livre a solução ATB nos primeiros 7 dias de protocolo; ATB + PL= grupo com acesso livre a solução ATB nos primeiros 7 dias de protocolo e tratado com solução probiótica nos últimos 7 dias de protocolo.

6. DISCUSSÃO

O transtorno depressivo maior é uma das maiores causas de incapacitação na sociedade atual. Com uma prevalência no Brasil de 3,3%, sendo mais de 7 milhões de indivíduos acometidos que necessitam de tratamento (BONADIMAN *et al.*, 2020). No presente trabalho foi observado que a modulação da população de *Lactobacillus* sp. na microbiota pelos protocolos DEXA e ATB induziu comportamentos do tipo depressivo e ansioso no modelo experimental adotado

Considerando as condições experimentais adotadas, os resultados sugerem a presença de comportamento depressivo e ansioso símile nos grupos Dexa e ATB, tendo em vista a diminuição do tempo no centro no campo aberto em ambos os grupos e a diminuição no número de rearings do grupo ATB. Por sua vez, os resultados do teste de suspensão da cauda corroboram esses achados, onde o grupo ATB obteve diminuição estatística no tempo de latência para primeira imobilidade e o grupo Dexa e ATB apresentaram aumento significativo quando avaliamos o tempo total de imobilidade. No teste do labirinto em cruz elevado, tanto Dexa quanto ATB tiveram diminuição estatística quanto ao tempo de permanência nos braços abertos. Todas as comparações foram feitas em relação ao grupo controle (salina), o qual não foi submetido a nenhum dos protocolos de indução do comportamento tipo depressivo.

Analisando inicialmente os parâmetros fisiológicos, no caso a evolução da avaliação ponderal, uma possível correlação entre depressão e alteração de peso é complexa, não tendo sido observado no presente estudo diferença estatística em relação ao peso ponderal. Desta forma, a evolução ponderal não é um fator decisivo quando se trata da confirmação do estado depressivo dos animais (MORETTI *et al.*, 2012a). Protocolos mais longos tendem a perceber melhor essas diferenças como foi o caso de Iñiguez *et al.* (2018) que teve duração de 8 semanas.

A diminuição do volume do córtex pré-frontal e hipocampo é bastante documentada, mas ainda não completamente elucidada. No presente trabalho, não foram encontradas diferenças estatísticas no volume do hipocampo e córtex pré-frontal em função do tratamento. Trabalhos de revisão como o de Belleau, Treadway e

Pizzagalli (2019) resumem o impacto dessa diminuição, mas não conclui o mecanismo pelo qual ocorre e foca em estudos crônicos, sendo uma área ainda não muito explorada pela academia em estudos de doses repetidas como o do presente trabalho.

Como foram utilizadas camundongos fêmeas no trabalho é importante o acompanhamento das fases do ciclo estral. Foi observado que, no geral, os animais estavam numa mesma fase do ciclo sendo essa diestro e metestro majoritariamente, diminuindo assim a chance de alterações comportamentais causadas pelas diferenças hormonais das várias fases do ciclo e provendo uma maior confiabilidade aos resultados comportamentais (BRENNAN *et al.*, 2007; MEZIANE *et al.*, 2006).

Em relação aos testes comportamentais, o teste do campo aberto é um teste altamente presente na literatura, avaliando uma visão geral do SNC do animal (STANFORD, 2007). Um dos parâmetros avaliados nesse teste foi o tempo no centro, parâmetro esse que sugere a presença de comportamento do tipo ansioso, onde animais ansiosos tendem a passar mais tempo próximos às paredes do campo por serem mais protegidas, evitando regiões mais expostas como o centro (CAROLA *et al.*, 2002). Ambos os grupos, Dexa e ATB, tiveram uma diminuição estatística de seu tempo no centro, como já era esperado, já os animais que foram tratados com a linhagem probiótica não tiveram diferença quando comparados com o grupo Salina. Esses resultados sugerem a presença de um comportamento ansioso símile nos grupos Dexa e ATB e a capacidade do tratamento com *Lactiplantibacillus plantarum* de reverter esse comportamento (ARAÚJO, 2018; CARNEIRO *et al.*, 2022; GERVAZIO, 2021).

Ainda sobre o teste do campo aberto, o menor número de *rearings* do grupo ATB demonstra um menor interesse nas atividades exploratórias instintivas do animal. O comportamento exploratório natural é de levantamento dos animais apoiados apenas nas patas traseiras para explorar o ambiente, farejando o local. Nesse teste, foi verificada a diminuição estatística apenas no grupo ATB, indicativo da redução do comportamento exploratório natural dos animais, sugerindo, de acordo com a literatura, a presença de um comportamento ansioso símile (GOULD; DAO; KOVASICS, 2009; STURMAN; GERMAN; BOHACEK, 2018).

O teste de suspensão da cauda é um ensaio consolidado na literatura, sendo considerado um padrão ouro quando se trata de avaliar a presença do comportamento do tipo depressivo. Foram avaliados a latência, o tempo que leva para a primeira

imobilidade, e o tempo de imobilidade, isto é, o tempo gasto pelos animais em não lutar por suas vidas quando postos numa situação de perigo inescapável, caracterizando como imóveis. Assim, animais com comportamentos do tipo depressivo possuem maiores tempos de imobilidade e menor tempo de latência (CAN *et al.*, 2012).

Quanto à latência, foi observado diminuição significativa no tempo do grupo ATB, tratado apenas com a solução antibiótica, configurando uma mais rápida desistência do comportamento de luta frente a situação de perigo inescapável. (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005). Quando avaliamos o tempo total de imobilidade no teste de suspensão da cauda, tanto o grupo Dexa, tratado apenas com glicocorticoide, quanto o ATB apresentaram aumento significativo, sugerindo assim a presença de comportamento do tipo depressivo em ambos os grupos de interesse como de acordo com a literatura. (MORETTI *et al.*, 2012a, 2012b; SKUPIO *et al.*, 2015; GERVAZIO, 2021; CARNEIRO *et al.*, 2022).

O teste do labirinto em cruz elevada é extremamente útil no estudo da ansiedade, sendo já consolidado na academia, ele avalia o ato de evitar regiões mais expostas, isso é os braços abertos do aparato. Animais mais ansiosos evitam os braços abertos, comportamento semelhante ao avaliado no tempo no centro do campo aberto. O número total de entradas em cada tipo de braço, aberto ou fechado é avaliado, assim como o tempo de permanência em ambos os braços. Foi verificado uma diminuição estatística no tempo de permanência nos braços abertos tanto no grupo Dexa e ATB, assim mostrando a aversão ao ambiente exposto e por consequência sugerindo a presença do comportamento ansioso nesses grupos (KOMADA; TAKAO; MYAKAWA, 2008; LIU; SCOTT; BURNHAM, 2022).

Sumarizando os dados comportamentais podemos verificar a presença do comportamento depressivo/ansioso nos grupos Dexa e ATB e os grupos tratados com a solução probiótica, não diferiram do grupo controle Salina, validando assim os modelos apresentados com base na literatura (GERVAZIO, 2021; CARNEIRO, *et al.*, 2022)

No estudo de Marin *et al.* (2017) foi observado que não apenas o transtorno depressivo símile pode levar a alterações na microbiota, mas o contrário também é verdadeiro. Alterações na composição da microbiota intestinal geram respostas no SNC, desencadeando comportamentos do tipo ansioso e depressivo. Por outro lado, a restauração da microbiota normal, por meio de suplementação, permite o retorno

comportamental do indivíduo em níveis basais, dados esses que corroboram com nossos resultados (SCHNEIDER *et al.*, 2023).

A população inicial de *Lactobacillus* sp. não apresentou diferença significativa entre os grupos em razão da microbiota residente estar nos parâmetros de camundongos saudáveis (DUAN *et al.* 2021), bem como os animais não haviam sido expostos a estímulos. No dia 7, na metade do protocolo, foi encontrada diferença estatística apenas nos grupos tratados com a solução ATB, no caso os grupos ATB e ATB+PL. Esse resultado já era esperado visto que o objetivo do tratamento antibiótico é exatamente inibir a microbiota normal desses animais. Outro ponto importante a ressaltar são os grupos tratados com a dexametasona (Dexa e Dexa+PL) que não sofreram impacto em termos da microbiota, visto que o tratamento com o corticoide, a curto prazo, pode não produzir ação sobre a microbiota intestinal (GERVAZIO, 2021).

No D=14, apenas os grupos Dexa e ATB mostraram diminuição significativa da população de lactobacilos totais, dado muito importante visto que demonstra o impacto do tratamento com o corticoide e antibiótico sobre a microbiota, além do potencial da linhagem probiótica de colonizar a microbiota dos animais, resultados estes que corroboram com a literatura (DINAN; CRYAN, 2013; CRUMEYROLLE-ARIAS *et al.*, 2014; NASERIBAFROUEI *et al.*, 2014; KELLY *et al.*, 2015; CAMPOS *et al.*, 2016; SCHNEIDER *et al.*, 2023).

Em estudo anterior, diferentes métodos de indução do comportamento depressivo, estresse subcrônico imprevisível e protocolo DEXA foram avaliados, assim como o impacto na população de *Lactobacillus* sp. na microbiota intestinal (GERVAZIO *et al.*, 2021). Nesse estudo, também foi observada uma diminuição significativa dessa população quando submetido aos protocolos de indução do comportamento depressivo, dados esses que corroboram com a literatura (MARIN *et al.*, 2017).

Os resultados do presente estudo mostram o impacto que a microbiota tem no comportamento dos animais e que a interrupção de sua homeostase está ligada ao surgimento do comportamento do tipo depressivo. O mecanismo por qual isso ocorre ainda não foi completamente elucidado, contudo, as hipóteses mais aceitas correlacionam as alterações da densidade e diversidade microbiana como parte fundamental da fisiopatologia do transtorno (MOLINA-TORRES *et al.*, 2019).

Em complemento, supõe-se que o perfil altamente inflamatório, causado pelo aumento da corticosterona circulante ou a presença do glicocorticoide dexametasona, possui efeito danoso na microbiota intestinal normal, impedindo a função imune que

regula a população intestinal e isto pode favorecer o desenvolvimento de bactérias oportunistas. Este cenário somado ao enfraquecimento das junções de oclusão (*tight junctions*) pode criar um favorecimento para a translocação de microrganismos do intestino para outras partes do corpo que, uma vez apresentando atividade imunológica reduzida, pode originar um processo inflamatório nessas regiões altamente enervadas com células neuronais e com comunicação com o nervo vago que liga diretamente ao SNC (MOLINA-TORRES *et al.*, 2019).

Ressalta-se que a restauração de certos grupos microbianos na microbiota intestinal já é uma terapia corriqueira na clínica para o tratamento de colites, síndrome do intestino irritável, diarreias causadas pelo uso de antibióticos entre outras doenças inflamatórias intestinais (WILLIAMS, 2010). Há evidências do efeito benéfico do uso de probióticos sobre a imunidade por diferentes vias, aumentando a produção de células imunológicas, reduzindo a inflamação, melhorando a barreira intestinal e competindo com bactérias patogênicas por nutrientes e locais de adesão. Além disso, os probióticos também podem modular a resposta imune, ajudando a regular a resposta inflamatória e a prevenir doenças autoimunes. No entanto, é importante destacar que mais pesquisas são necessárias para entender completamente os efeitos dos probióticos na imunidade e em diferentes doenças (EVRENSEL; UNSALVER; CEYLAN, 2019).

A microbiota intestinal é intimamente associada à comunicação bidirecional com o eixo cérebro-intestino, modulando funções neurofisiológicas (MARIN, *et al*, 2017). O uso de probiótico é um tratamento consolidado, entretanto seus efeitos em transtornos do sistema nervoso ainda não foram completamente elucidados. Liu e colaboradores (2020) empregaram uso de um consórcio microbiano composto por *L. plantarum* e pode atestar seu efeito antidepressivo comparável ao da fluoxetina, droga padrão usada no tratamento o transtorno depressivo maior.

Liao e colaboradores (2020) testaram *L. plantarum* em modelo de doença de Parkinson e o probiótico demonstrou grande potencial de inibição do processo neurodegenerativo da doença, além de produzir efeito neuroprotetor por redução da queda dos neurotransmissores, assim como verificou menor presença de interleucinas pró-inflamatórias.

A *L. plantarum* já mostrou atividades diversas quando usada como probióticos, o trabalho de Moreno-Montoro e colaboradores (2017) verificaram que o leite de cabra adicionado da *L. plantarum* apresentou peptídeos bioativos que podem ser

responsáveis por atividades antioxidante e inibitória da enzima conversora de angiotensina (ECA), importante na fisiopatologia e tratamento da hipertensão. O trabalho de Bomfim e colaboradores (2020) caracterizou a atividade de exopolissacarídeos (EPS) produzidos pela *L. plantarum* CNPC003, e esses EPS apresentaram forte atividade antioxidante *in vitro*, mostrando um grande potencial pró saúde da linhagem em questão.

A mesma linhagem utilizada no presente estudo, *L. plantarum* CNPC003, já foi aplicada como probiótico em estudos realizados com queijo de cabra do tipo “*petit suisse*”. Sua adição não afetou características físico-químicas, mas melhorou textura e cor do produto, além de, juntamente com a adição de polpa de acerola, conferir uma maior gama de compostos bioativos ao queijo do estudo, como compostos antioxidantes, aminoácidos e polifenóis (BARCELOS *et al.*, 2020).

O presente trabalho mostrou o impacto da modulação da população intestinal de *Lactobacillus* sp., onde uma metodologia de indução do comportamento depressivo e uma metodologia de modulação dessa população microbiana intestinal, conseguiram induzir comportamento depressivo símile e diminuição da população intestinal de *Lactobacillus* sp. em camundongos fêmeas, e a suplementação com o *L. plantarum* CNPC003 obteve êxito em reverter esse comportamento a sua normalidade. Sugerindo assim uma possível via de tratamento suporte aos tratamentos já convencionais.

7. CONCLUSÃO

Foi detectada nos camundongos fêmeas a presença do comportamento depressivo e ansioso símile nos testes comportamentais de campo aberto, labirinto em cruz elevada e o teste de suspensão da cauda tanto nos animais submetidos ao protocolo Dexa como aos submetidos ao protocolo ATB. Finalmente, foi possível verificar que houve diminuição na população de *Lactobacillus* sp. ao final dos 14 dias de experimento e o tratamento com *Lactiplantibacillus plantarum* CNP003, a uma concentração de 10^9 UFC/mL, conseguiu reverter tanto o comportamento do tipo depressivo quanto o comportamento do tipo ansioso através dos testes utilizados.

REFERÊNCIAS

- AHN, Y. T. Characterization of *Lactobacillus acidophilus* isolated from piglets and chicken. **Asian-Australasian Journal Animal Sciences**, v. 12, p. 1790-1797, 2002.
- AGID, O.; KOHN, Y.; LERER, B. Environmental stress and psychiatric illness. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 54, n. 3, p. 135-141, 2000.
- ALBERT, P.R. Why is depression more prevalent in women?. **Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN**, v. 40, n. 4, p. 219, 2015.
- ALMEIDA, R. N.; OLIVEIRA, T. M. L. Triagem farmacológica comportamental. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 131-137, 2006.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **DSM-5: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. Artmed Editora, 2014.
- ARAÚJO, A.N.V. **Investigação da atividade antidepressiva do orto-eugenol em modelos comportamentais de depressão induzidos por dexametasona**. 2018, 85 f. Dissertação (Mestrado em Neurociência Cognitiva e Comportamental – Neurociência pré-clínica e clínica) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.
- BARCELOS, S. C. *et al.* Effect of acerola (*Malpighia emarginata* DC) pulp incorporation on potentially probiotic Petit-Suisse goat cheese. **Journal of Food Processing and Preservation**, e14511, 2020.
- BELLEAU, E. L.; TREADWAY, M. T.; PIZZAGALLI, D. A. The impact of stress and major depressive disorder on hippocampal and medial prefrontal cortex morphology. **Biological Psychiatry**, v. 85, n. 6, p. 443-453, 2019.
- BENTLEY, S. M.; PAGALILAUAN, G. L.; SIMPSON, S. A. Major depression. **Medical Clinics**, v. 98, n. 5, p. 981-1005, 2014.
- BONADIMAN, C. S. C. *et al.* Depressive disorders in Brazil: results from the Global Burden of Disease Study 2017. **Population Health Metrics**, v. 18, n. 1, p. 1-13, 2020.
- BOMFIM, V. B. *et al.* Partial characterization and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* CNPC003. **LWT**, v. 127, p. 109349, 2020.
- BOWERS, S L. *et al.* Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, n. 1, p. 105-113, 2008.
- BRENNAN, K. C. *et al.* Reduced threshold for cortical spreading depression in female mice. **Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society**, v. 61, n. 6, p. 603-606, 2007.

- BYERS, S. L. *et al.* Mouse estrous cycle identification tool and images. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e35538, 2012.
- CAMPOS, A. C. *et al.* Absence of gut microbiota influences lipopolysaccharide-induced behavioral changes in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 312, p. 186-194, 2016.
- CAN, A. *et al.* The tail suspension test. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 59, 2012.
- CARNEIRO, C. A. *et al.* Unpredictable subchronic stress induces depressive-like behavior: Behavioral and neurochemical evidences. **Psychology & Neuroscience**, v. 15, n. 3, p. 236-250, 2022.
- CAROLA, V. *et al.* Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behavioural Brain Research**, v. 134, n. 1-2, p. 49-57, 2002.
- CHEUNG, S. G. *et al.* Systematic review of gut microbiota and major depression. **Frontiers in Psychiatry**, v. 10, p. 34, 2019.
- CHOPYK, D. M.; GRAKOU, A. Contribution of the intestinal microbiome and gut barrier to hepatic disorders. **Gastroenterology**, v. 159, n. 3, p. 849-863, 2020.
- CLARKE, G. *et al.* Gut Reactions: breaking down xenobiotic–microbiome interactions. **Pharmacological Reviews**, v. 71, p. 198-224, 2019.
- CRUMEYROLLE-ARIAS, M. *et al.* Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 42, p. 207-217, 2014.
- CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4-5, p. 571-625, 2005.
- DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. Melancholic microbes: a link between gut microbiota and depression?. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 25, n. 9, p. 713-719, 2013.
- DUAN, J. *et al.* Characterization of gut microbiome in mice model of depression with divergent response to escitalopram treatment. **Translational Psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 303, 2021.
- DUMAN, C. H. Models of depression. **Vitamins & Hormones**, v. 82, p. 1-21, 2010.
- EVRENSEL, A.; ÜNSALVER, B. Ö.; CEYLAN, M. E. Psychobiotics. **Frontiers in Psychiatry: Artificial Intelligence, Precision Medicine, and Other Paradigm Shifts**, p. 565-581, 2019.
- FOSTER, A. J. *et al.* Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. **Trends in neurosciences**, v. 36, n. 5, p. 305-312, 2013.

- FOSTER, A. J. *et al.* Gut microbiota and brain function: an evolving field in neuroscience. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 5, p. 114, 2016.
- GERVAZIO, K. Y. Comparação de diferentes modelos de indução da depressão em camundongos e suas implicações comportamentais e na população de lactobacilos. 2021, 53 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2021.
- GOLAN, D.E. *et al.* **Princípios de Farmacologia - A base fisiopatológica da farmacoterapia**. 3. ed., Guanabara Koogan, 2014.
- GOLD, P.W.; MACHADO-VIEIRA, R.; PAVLATOU, M.G. Clinical and biochemical manifestations of depression: relation to the neurobiology of stress. **Neural Plasticity**, v. 2015, 2015.
- GOLDSTEIN, E. J. C; TYRRELL, K. L.; CITRON, D. M. *Lactobacillus* species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, p. S98-S107, 2015.
- GOULD, T. D.; DAO, D. T.; KOVACSICS, C. E. The open field test. In: GOULD, T. D. **Mood and anxiety related phenotypes in mice**: characterization using behavioral tests. Humana Press/Springer Nature, 2009, p. 1–20.
- GRAF, D. *et al.* Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 26, n. 1, p. 26164, 2015.
- HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, n. 3, p. 385, 1934.
- HAMMES, W. P.; VOGEL, R. F. The genus *Lactobacillus*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Boston: Springer, 1995. vol. 2, p. 19-54.
- HASLER, G. Pathophysiology of depression: do we have any solid evidence of interest to clinicians?. **World Psychiatry**, v. 9, n. 3, p. 155, 2010.
- IHME - Institute for Health Metrics and Evaluation. Global Burden of Disease Study 2019 (GBD 2019) Results. **Global Burden of Disease Collaborative Network**. Disponível em: <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>. Acesso em: 31 jan. 2023.
- IÑIGUEZ, S. D. *et al.* Vicarious social defeat stress induces depression-related outcomes in female mice. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 1, p. 9-17, 2018.
- IWATA, M.; OTA, K. T.; DUMAN, R. S. The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 31, p. 105-114, 2013.

JOVEL, J. *et al.* Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 459, 2016.

KARLOVIĆ, D. *et al.* Serum concentrations of CRP, IL-6, TNF- α and cortisol in major depressive disorder with melancholic or atypical features. **Psychiatry Research**, v. 198, n. 1, p. 74-80, 2012.

KELLER, J. *et al.* HPA axis in major depression: cortisol, clinical symptomatology and genetic variation predict cognition. **Molecular Psychiatry**, v. 22, p. 527–536, 2017.

KELLER, J. *et al.* Cortisol circadian rhythm alterations in psychotic major depression. **Biological Psychiatry**, v. 60, n. 3, p. 275-281, 2006.

KELLY, J. R. *et al.* Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, p. 392, 2015.

KIM, D. *et al.* Relation of microbial biomass to counting units for *Pseudomonas aeruginosa*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 21, p. 4620-4622, 2012.

KIM, S.; JAZWINSKI, S. M. The gut microbiota and healthy aging: a mini-review. **Gerontology**, v. 64, n. 6, p. 513-520, 2018.

KOMADA, M.; TAKAO, K.; MIYAKAWA, T. Elevated plus maze for mice. **JoVE** (Journal of Visualized Experiments), n. 22, p. e1088, 2008.

LASALVIA, E. A.; DOMEK, G. J.; GITLIN, D. F. Fluoroquinolone-induced suicidal ideation. **General Hospital Psychiatry**, v. 1, n. 32, p. 108-110, 2010.

LAVILLA-LERMA, L. *et al.* Characterization of functional, safety, and gut survival related characteristics of Lactobacillus strains isolated from farmhouse goat's milk cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, n. 2–3, p. 136-145, 2013.

LI, Y. *et al.* Inflammasomes as therapeutic targets in human diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 247, 2021.

LIAO, J. *et al.* *Lactobacillus plantarum* PS128 alleviates neurodegenerative progression in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced mouse models of Parkinson's disease. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 90, p. 26-46, 2020.

LISTER, R. G. Ethological-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacological Therapy**, v. 46, p. 321-340, 1990.

LIU, Q. F. *et al.* Effect of probiotic administration on gut microbiota and depressive behaviors in mice. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, p. 181-189, 2020.

LIU, J.; SCOTT, B. W.; BURNHAM, W. M. Effects of cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol in the elevated plus maze in mice. **Behavioural Pharmacology**, v. 33, n. 2-3, p. 206-212, 2022.

MAGGIONI, Eleonora et al. Common and different neural markers in major depression and anxiety disorders: A pilot structural magnetic resonance imaging study. **Psychiatry Research: Neuroimaging**, v. 290, p. 42-50, 2019.

MARIN, I. A. et al. Microbiota alteration is associated with the development of stress-induced despair behavior. **Scientific Reports**, v. 7, p. 43859, 2017.

MARGIS, R. et al. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 25, p. 65-74, 2003.

MCLEAN, A. C. et al. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 67, 2012.

MEZIANE, H. et al. Estrous cycle effects on behavior of C57BL/6J and BALB/cByJ female mice: implications for phenotyping strategies. **Genes, Brain and Behavior**, v. 6, n. 2, p. 192-200, 2006.

MILLER, A. H.; MALETIC, V.; RAISON, C. L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. **Biological Psychiatry**, v. 65, n. 9, p. 732-741, 2009.

MINEUR, Y. S.; BELZUNG, C.; CRUSIO, W. E. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 175, n. 1, p. 43-50, 2006.

MOLINA-TORRES, G. et al. Stress and the gut microbiota-brain axis. **Behavioural Pharmacology**, v. 30, n. 2, p. 187-200, 2019.

MORATO, S. O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. *Psicologia USP*, v. 17, n. 4, p. 159-174, 2006.

MORENO-MONTORO, M. et al. Antioxidant, ACE-inhibitory and antimicrobial activity of fermented goat milk: activity and physicochemical property relationship of the peptide components. **Food & Function**, v. 8, n. 8, p. 2783-2791, 2017.

MORETTI, M. et al. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **Journal of Psychiatric Research**, v. 46, p. 331-340, 2012a.

MORETTI, M., et al. Involvement of nitric oxid-cGMP pathway in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the tail suspension test. **Behavioural Brain Research**, v. 225, p. 328-333, 2012b.

MULINARI, Shai. Monoamine theories of depression: historical impact on biomedical research. **Journal of the History of the Neurosciences**, v. 21, n. 4, p. 366-392, 2012.

MURPHY, J. R. *et al.* Maternal peripartum antibiotic exposure and the risk of postpartum depression. **Research in Nursing & Health**, v. 41, n. 4, p. 369-377, 2018.

NASERIBAFROUEI, A. *et al.* Correlation between the human fecal microbiota and depression. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 26, n. 8, p. 1155-1162, 2014.

NESTLER, E. J. *et al.* Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, p. 13-25, 2002.

ORG, E. *et al.* Sex differences and hormonal effects on gut microbiota composition in mice. **Gut Microbes**, v. 7, n. 4, p. 313-322, 2016.

OVERSTREET, D. H. Modeling depression in animal models. **Methods in Molecular Biology**, v. 829, p. 125-144, 2012.

PELLOW, S. *et al.* Validation of elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

RICHELSON, E. Pharmacology of antidepressants. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 76, n. 5, p. 511-527, 2001.

SCHNEIDER, E. *et al.* Effect of short-term, high-dose probiotic supplementation on cognition, related brain functions and BDNF in patients with depression: a secondary analysis of a randomized controlled trial. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 48, n. 1, p. E23-E33, 2023.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **American Journal of Psychiatry**, v. 122, n. 5, p. 509-522, 1965.

SELYE, H. The evolution of the stress concept: the originator of the concept traces its development from the discovery in 1936 of the alarm reaction to modern therapeutic applications of syntoxic and catatonic hormones. **American Scientist**, v. 61, n. 6, p. 692-699, 1973.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 4, p. 894-907, 2000.

SIBA, I. P. **Avaliação pré-clínica do potencial efeito antidepressivo da miricitrina em modelos animais**. 2013, 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

SILVA, N.; TANIWAKI, M.H.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; OKAZAKI, M.M.; GOMES, R.A.R. **Microbiological examination methods of food and water: a laboratory manual**. 2nd ed., Boca Raton: CRC Press, 2018, 564p.

SKUPIO, U. *et al.* Behavioral and molecular alterations in mice resulting from chronic treatment with dexamethasone: relevance to depression. **Neuroscience**, v. 286, p. 141-150, 2015.

SLAVICH, G. M. & SACHER, J. (2019). Stress, sex hormones, inflammation, and major depressive disorder: Extending Social Signal Transduction Theory of Depression^[1] to account for sex differences in mood disorders.

Psychopharmacology, 236:3063–3079

SOUZA, A. C.; ALEXANDRE, N. M. C.; GUIRARDELLO, E. B. Propriedades psicométricas na avaliação de instrumentos: avaliação da confiabilidade e da validade. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 26, p. 649-659, 2017.

STANFORD, S. C. The Open Field Test: reinventing the wheel. **Journal of Psychopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 134-135, 2007.

STERNER, E. Y.; KALYNCHUK, L. E. Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: Relevance to depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 5, p. 777–790, 2010.

STOPA, S. R. *et al.* Prevalência do autorrelato de depressão no Brasil: resultados da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 2, p. 170-180, 2015.

STURMAN, O.; GERMAIN, P.; BOHACEK, J. Exploratory rearing: a context-and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. **Stress**, v. 21, n. 5, p. 443-452, 2018.

WILLIAMS, N. T. Probiotics. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 67, n. 6, p. 449-458, 2010.

WRÓBEL, A. *et al.* The depressogenic-like effect of acute and chronic treatment with dexamethasone and its influence on the activity of antidepressant drugs in the forced swim test in adult mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 54, p. 243–248, 2014.

ZAGO, M. *et al.* Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1033–1040, 2011.

ZHAO, W. *et al.* Transplantation of fecal microbiota from patients with alcoholism induces anxiety/depression behaviors and decreases brain mGluR1/PKC ϵ levels in mouse. **BioFactors**, v.46, n. 1, p. 38-54, 2020.

APENDICE A



Universidade
Federal da
Paraíba



Universidade Federal da Paraíba

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Variação da população de *Lactobacillus* spp. por alteração neuroendócrina em modelo murínico", protocolada sob o CEUA nº 5467061021 (ID 001523), sob a responsabilidade de **Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 10/12/2021.

We certify that the proposal "Cellular density variation of *Lactobacillus* spp. by neuroendocrine alteration in murical molel", utilizing 120 Heterogenics mice (120 females), protocol number CEUA 5467061021 (ID 001523), under the responsibility of **Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 12/10/2021.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de 04/2022 a 03/2023 Área: [Biotecnologia](#)

Origem: [Unidade de Produção Animal IPeFarM](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [2 a 3 meses](#)

Quantidade: [120](#)

Linhagem: [Mus musculus - Swiss](#)

Peso: [25 a 30 g](#)

João Pessoa, 08 de março de 2023

Prof. Dr. Luiz Henrique César Vasconcelos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Gláucia Veríssimo Faheina Martins
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

