



A SUPLEMENTAÇÃO PROBIÓTICA TEM EFEITO PROTETOR NA ANSIEDADE PROVOCADA PELA PRIVAÇÃO DE SONO?

Palavras-Chave: Ansiedade; Privação de Sono; Probiótico.

Autoras:

Gabriela Zamariam Pierro, FCA – UNICAMP

Doutoranda Beatriz da Silva Franco, FCA – UNICAMP

Maria Laysa Capistrano da Silva, FCA – UNICAMP

Prof^ª. Dr^ª. Andrea Maculano Esteves, FCA – UNICAMP

INTRODUÇÃO

O sono atua na regulação de diversos funcionamentos fisiológicos (Krueger et al., 2016), uma vez que a sua qualidade e a ritmicidade circadiana afetam diretamente diversos hormônios e processos metabólicos (Kim; Jeong; Hong, 2015), além do funcionamento da memória (Rash; Born, 2013).

No âmbito do sono em mamíferos, existem duas etapas que se alternam de forma cíclica, o sono NREM (em inglês non-rapid-eye-movement) ou sono de ondas lentas (SOL) (em inglês SWS - slow-wave sleep) e o sono REM (rapid-eye-movement). O período NREM apresenta ondas de atividade cerebral lentas de alta amplitude, enquanto o sono REM possui ondas de oscilação rápida e de baixa amplitude (Rash; Born, 2013).

A falta de sono quando observada em uma forma repetitiva influencia no desenvolvimento de distúrbios como insônia e estresse (Griffin et al., 2022). Pires, Tufik e Andersen afirmam que a ansiedade é um efeito clássico da privação de sono (2013). Da mesma forma, Dement (1960) constatou pela primeira vez a ansiedade, associada a déficits de concentração e irritabilidade, como uma das principais consequências neurocomportamentais da privação do sono REM.

Chung e colaboradores (2023) demonstraram que os danos da homeostase fisiológica e da ansiedade provocados pela privação do sono, podem ser reduzidos através da modulação da microbiota induzida pelo uso crônico de prebióticos. Neste mesmo estudo, ainda foram apresentadas alterações significativas nos comportamentos relacionados à ansiedade, que após a suplementação probiótica, foram consideravelmente amenizados (Chung et al., 2023).

A associação dos probióticos *Lactobacillus helveticus* R0052 e *Bifidobacterium longum* R0175, através do eixo intestino-cérebro, demonstrou agir de forma ansiolítica prevenindo neurogênese hipocampal, além das alterações na plasticidade sináptica causada por estresse, se tornando um possível alvo terapêutico (Ait-Belgnaoui et al., 2014).

O teste de caixa de atividade age como um medidor de ansiedade através da contagem de tempo que o animal obteve em sua deambulação periférica e central. Conforme o animal perambula mais ao centro, evitando a periferia da caixa, sinais de ansiedade podem ser observados (Seibenhener; Wooten, 2015). Assim, o objetivo do presente estudo foi analisar o impacto da privação de sono REM na ansiedade de camundongos, e os impactos da suplementação probiótica como fator protetor.

METODOLOGIA

Para a execução do projeto foram utilizados camundongos C57BL/6J com 28 dias de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Todos os procedimentos foram submetidos à aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP. Durante o período de estudo, os animais foram mantidos em salas aclimatizadas (média de 23°C) com ciclo claro-escuro constante (12/12h), com ração e livre acesso à água, acondicionados em gaiolas com 4 animais.

Grupos Experimentais

Foi utilizado um método de randomização em gaiolas para distribuir os animais aleatoriamente em quatro grupos:

1. Grupo CTRL: Não submetidos à suplementação e nem à indução de estresse (PS).
2. Grupo CTRL-PS: Submetidos ao estresse por protocolo de privação de sono REM, sem suplementação com probióticos.
3. Grupo Prob-CTRL: Submetidos a suplementação com os probióticos *Lactobacillus helveticus* R0052 e *Bifidobacterium longum* R0175, porém sem indução de estresse (PS).
4. Grupo Prob-PS: Submetidos à suplementação com os probióticos *Lactobacillus helveticus* R0052 e *Bifidobacterium longum* R0175 e induzidos ao estresse por protocolo de privação do sono REM.

Delineamento Experimental

O experimento teve início aos 28 dias de vida (desmame) dos camundongos. Os grupos Prob foram submetidos à suplementação dos probióticos *Lactobacillus helveticus* R0052 e *Bifidobacterium longum* R0175 via pipetagem a partir de 60 dias de vida, com frequência de 5 dias por semana, durante 6 semanas. Após essas 6 semanas de suplementação, os animais passaram pelo teste da Caixa de Atividade. Logo após, foi realizado um protocolo de privação de sono REM, durante os 2 dias (48 horas). Durante a privação de sono, a suplementação de probióticos continuou acontecendo. Em seguida, o teste comportamental foi realizado novamente. Após a realização do teste, os animais foram eutanasiados.



Figura 1. Delineamento experimental. Legenda: Cx Atv- teste de caixa de atividade.

Procedimentos Experimentais

Suplementação de Probióticos: Os probióticos utilizados foram uma mistura de duas cepas *Lactobacillus helveticus* R0052 e *Bifidobacterium longum* R0175. Os grupos probióticos receberam via pipetagem 200 ul da mistura de probióticos, enquanto os grupos controles receberam 200 ul de solução salina. Todos os animais foram gradualmente introduzidos à pipetagem com solução salina ao longo de duas semanas, antes de iniciar a suplementação.

Privação de Sono REM: A indução de estresse ocorreu antes do fim da suplementação e foi feita através da Privação de Sono Paradoxal (REM) por 48h utilizando o método de plataforma única. Um grupo de 4 camundongos foi alojado em recipiente (41,0 cm de comprimento x 34,0 cm de largura x 16,5 cm de altura) contendo água, sobre plataforma de 3 cm de diâmetro, a qual permaneceu imersa na água até 1 cm da sua borda. O número de plataformas foi superior ao número de animais para que os animais pudessem se movimentar durante o teste. Todos os animais foram habituados à sala privação de sono, bem como aos seus ambientes experimentais (Nunes; Tufik, 1994), e tiveram livre acesso à comida e bebida.

Caixa de Atividade (Open Field): O comportamento dos animais foi analisado por meio da caixa de atividade (locomoção e comportamento de limpeza). Registros da atividade locomotora foram obtidos por gaiolas de 30cm x 30cm. Por meio de uma câmera, os movimentos dos animais foram determinados por sensores de rastreamento. A rota analisada dividiu-se em 16 quadrantes, sendo 4 na área central e 12 na área periférica. O tempo de permanência (segundos) em cada área e o número de quadrantes percorridos foram registrados. A natureza ou velocidade dos movimentos não foi analisada. As contagens totais de atividade locomotora foram registradas durante 5 minutos usando o programa Arena Video Tracking-Bonther.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de Caixa de Atividade foi realizado em dois momentos. O primeiro período foi o basal, após 6 semanas de suplementação probiótica, enquanto o segundo período foi realizado 48h depois, após a privação de sono aguda.

Os resultados abaixo mostram a porcentagem do tempo considerando os 5 minutos de contagem do comportamento locomotor, que os animais ficaram nos quadrantes periféricos

(Fig 2) ou nos quadrantes centrais (Fig 3). Além disso, o número total de entradas em quadrantes foi contabilizado (Fig 4).

Na Caixa de Atividade (Open Field), a ambulação periférica (Fig 2), ambulação central (Fig 3) e ambulação total (Fig 4), foram analisados pelo modelo Misco com post hoc Tukey ($p < 0,05$), onde foi realizada a análise de interação Grupo x Tempo. Nenhuma diferença significativa foi encontrada para ambulação periférica ($F(3, 28) = 2,228$, $p = 0,107$), ambulação central ($F(3, 30) = 2,330$, $p = 0,094$) e ambulação total ($F(3, 27) = 2,548$, $p = 0,076$).

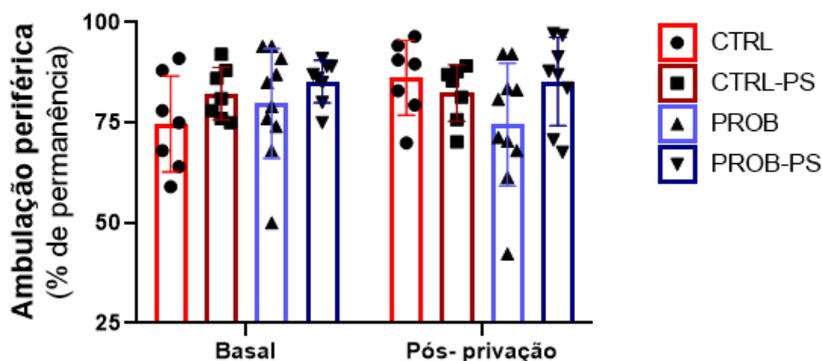


Figura 2. Porcentagem do tempo de permanência na periferia da caixa de atividade (Open Field) realizado antes da privação (basal) e pós-privação de sono de 48 horas. Dados apresentados em valores individuais, médias e desvio padrão, ($n = 7-10$). Os dados foram analisados pelo Modelo Misco, com post hoc Tukey ($p < 0,05$).

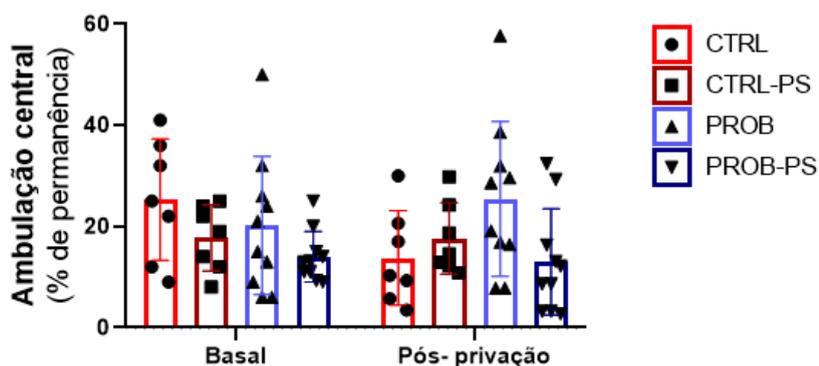


Figura 3. Porcentagem do tempo de permanência no centro da caixa de atividade (Open Field) realizado antes da privação (basal) e pós-privação de sono de 48 horas. Dados apresentados em valores individuais, médias e desvio padrão, ($n = 7-10$). Os dados foram analisados pelo Modelo Misco, com post hoc Tukey ($p < 0,05$).

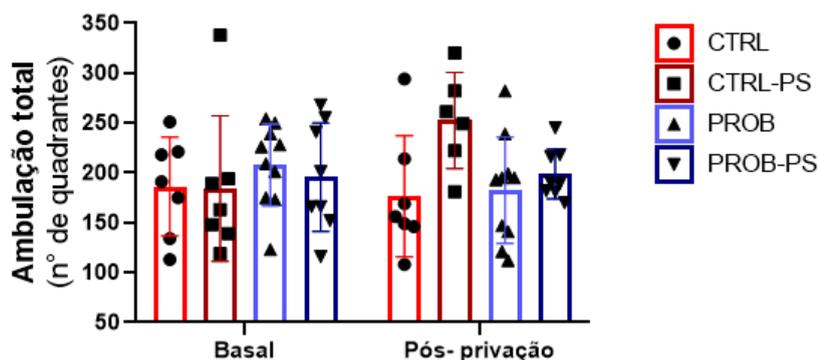


Figura 4. Número de quadrado totais percorridos na caixa de atividade (Open Field) realizado antes da privação (basal) e pós-privação de sono de 48 horas. Dados apresentados em valores individuais, médias e desvio padrão, (n=6-10). Os dados foram analisados pelo Modelo Misco, com post hoc Tukey ($p < 0,05$).

CONCLUSÕES

Considerando o protocolo de privação de sono realizado, não foi encontrada nenhuma alteração no teste de Open Field relacionada à ansiedade. Apesar da caracterização dos probióticos utilizados como um possível alvo terapêutico, mais estudos são necessários para determinar a eficácia de cepas probióticas na manutenção e melhora dos efeitos ansiolíticos causados pela privação de sono.

BIBLIOGRAFIA

- AIT-BELGNAOUI, A. et al. Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, v. 26, n. 4, p. 510–520, 2014. DOI <https://doi.org/10.1111/nmo.12295>.
- CHUNG, Y.; WU, J.-L.; HUANG, W.-C. Effects of prebiotics on intestinal physiology, neuropsychological function, and exercise capacity of mice with sleep deprivation. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, v. 165, n. 112568, p. 112568, 2023. DOI 10.1016/j.foodres.2023.112568.
- DEMENT, W. The effect of dream deprivation: The need for a certain amount of dreaming each night is suggested by recent experiments. *Science (New York, N.Y.)*, v. 131, n. 3415, p. 1705–1707, 1960.
- GRIFFIN, S. M. et al. Restorative effects of probiotics on memory impairment in sleep-deprived mice. *Nutritional neuroscience*, v. 26, n. 3, p. 254–264, 2022. DOI 10.1080/1028415X.2022.2042915.
- KIM, T. W.; JEONG, J.-H.; HONG, S.-C. The impact of sleep and circadian disturbance on hormones and metabolism. *International journal of endocrinology*, v. 2015, p. 591729, 2015.
- KRUEGER, J. M. et al. Sleep function: Toward elucidating an enigma. *Sleep medicine reviews*, v. 28, p. 46–54, 2016.
- NUNES, G. J.; TUFIK, S. Validation of the modified multiple platform method (MMP) of paradoxical sleep deprivation in rats. *Sleep Research*, v. 22(Suppl), p. 339, 1994.
- PIRES, G. N.; TUFIK, S.; ANDERSEN, M. L. Grooming analysis algorithm: Use in the relationship between sleep deprivation and anxiety-like behavior. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 41, p. 6–10, 2013.
- RASCH, B.; BORN, J. *About sleep's role in memory*. *Physiological reviews*, v. 93, n. 2, p. 681–766, 2013.
- SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *Journal of visualized experiments: JoVE*, n. 96, 2015.