



EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE PROBIÓTICOS LACTIBACILLUS HELVETICUS R0052 E BIFIDOBACTERIUM LONGUM R0175 NA INFLAMAÇÃO HIPOCAMPAL CAUSADA PELA PRIVAÇÃO DE SONO

Palavras-chave: Privação do sono, probióticos e inflamação.

MARIA LAYSA CAPISTRANO DA SILVA , FCA, UNICAMP.

GABRIELA ZAMARIAM, FCA, UNICAMP.

BEATRIZ FRANCO, FEF, UNICAMP.

ADRIANE ANTUNES, FCA, UNICAMP.

ADRIANA TORSONI, FCA, UNICAMP

ANDREA MACULANO ESTEVES, FCA, UNICAMP.

INTRODUÇÃO

O sono é um fator extremamente importante que contribui para o bom funcionamento do organismo humano, principalmente por atuar exercendo os principais mecanismos reguladores do corpo, com reparo dos tecidos, crescimento muscular e a síntese de proteínas (PFIZER, 2020). Além disso, como diz Frank (2019), é durante o sono que ocorre o mecanismo restaurador de equilíbrio natural entre os centros neuronais, maturação cerebral e conservação de energia metabólica, fatores estes importantes para a homeostasia do corpo e para a saúde geral.

Além disso, ignorar o sono adequado significa comprometer as atividades regulatórias, hormonais, fisiológicas e de reparação psicológica do corpo, aumentando os problemas de saúde como diabetes, doenças cardíacas e alterações na quantidade de cortisol, hormônio associado ao estresse e à doenças inflamatórias (Souza et al., 2015). Estudos mostram que a privação de sono pode gerar um aumento significativo em marcadores inflamatórios como PCR e IL-6, além de maiores aumentos no receptor TLR-4 que estimula a produção de citocinas inflamatórias por monócitos assim como aumento do fator nuclear (NF)- κ B (Irwin et al., 2016; Olmstead et al., 2016; Carroll et al., 2016).

A utilização de cepas de probióticos vêm sendo utilizadas na investigação da redução de sintomas de estresse, demonstrando que a suplementação de microrganismos vivos intervém no eixo microbiota-intestinal-cérebro provocando efeitos imunomoduladores e melhora na cognição, no humor, em parâmetros fisiológicos e na resposta ao estresse (Konturek et al., 2011; Liang et al., 2015; Liu et al., 2016 ; Síle et al., 2023). Dessa forma, o uso de probióticos está relacionado à alterações significantes na microbiota intestinal, em alterações na atividade metabólica e em condições físico-químicas do intestino, auxiliando os organismos de forma unidireccional (Slikerman et al., 2022). É por esse motivo que o uso de probióticos vem sendo associado à estratégias para manejo do estresse e à qualidade de vida e outros benefícios para a saúde (Konturek.,et al 2011). As bactérias do GÊNERO *Lactobacillus Helveticus R0052* e *Bifidobacterium longum R0175* são caracterizadas com uma ampla variedade de atributos benéficos como ativação da imunidade, participação no metabolismo e inibição de patógenos intestinais, além de serem considerados uma grande promessa para proteção contra lesões inflamatórias (Hidalgo et al., 2016).

Assim, o cérebro e o sistema digestivo (eixo intestino-cérebro) estão intimamente relacionados, compartilhando terminações nervosas que permitem ampla comunicação por meio de sinapses e neurotransmissores (Ozan et al.,2019; Tanik et al.,2019; Inan et al.,2019), e são um sistema importante para manter a homeostase, cujo desequilíbrio leva a mudanças gerais nas respostas ao estresse e no comportamento (Klein e O'Mahony et al., 2011). Consequentemente, a função de um órgão afeta diretamente o outro e, assim, o funcionamento prejudicado do intestino pode levar a distúrbios do sistema nervoso central (Del'Arco et al.,2017; Magalhães et al.,2017; Quilici et al.,2017). Conforme discutido em Sleep Reflects Gut Health (2021), a qualidade do sono está diretamente relacionada à eficiência dessa comunicação do eixo intestino-cérebro, uma vez que as bactérias intestinais são produtoras de neurotransmissores como GABA (agente de desaceleração da atividade cerebral), dopamina (atua no sistema nervoso central) e serotonina, que facilita a comunicação entre os neurônios no cérebro e no sistema intestinal. Sendo assim, a privação do sono é um estressor biológico que gera mudanças estruturais e funcionais significativas na microbiota intestinal (Wang et al., 2022). No entanto, ainda não se sabe exatamente o efeito de probióticos na via inflamatória cerebral após a privação do sono pela falta de literatura existente sobre determinado assunto, dessa forma, acreditamos na necessidade de implementar estudos sobre o uso de probióticos na melhora das consequências causadas pela privação de sono no nosso laboratório, com o intuito de desenvolver mais conteúdo, análises e técnicas para tal. Dessa forma o projeto em questão tem como objetivo investigar o efeito do consumo crônico de probióticos do tipo *Lactobacillus Helveticus* R0052 e *Bifidobacterium longum*

R0175 no sistema inflamatório avaliando o conteúdos protéicos de pJNK, NFkB, TLR4 e no hipocampo dos camundongos após um evento de privação de sono.

METODOLOGIA DA PESQUISA

Para a execução do projeto, foram utilizados camundongos C57 machos (n=8 por grupo) 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:

- Grupo CTRL:** Submetido à suplementação e nem à indução de estresse.
- Grupo CTRL-PS:** Submetido ao estresse por protocolo de privação de sono REM, sem suplementação com probióticos.
- Grupo PROB:** Submetido à suplementação com os probióticos *Lactobacillus helveticus* R0052 e *Bifidobacterium longum* R0175, porém sem indução de estresse.
- **Grupo PROB-PS:** Submetido à suplementação com os probióticos *Lactobacillus helveticus* R0052 e *Bifidobacterium longum* R0175 e induzido 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, foi realizado um protocolo de privação de sono REM durante 48 horas. Durante a privação de sono, a suplementação de probióticos continuou acontecendo. Após a privação do sono, os animais foram eutanasiados e o hipocampo foi coletado para a análise das proteínas do sistema inflamatório por western blotting assim como na figura 1.

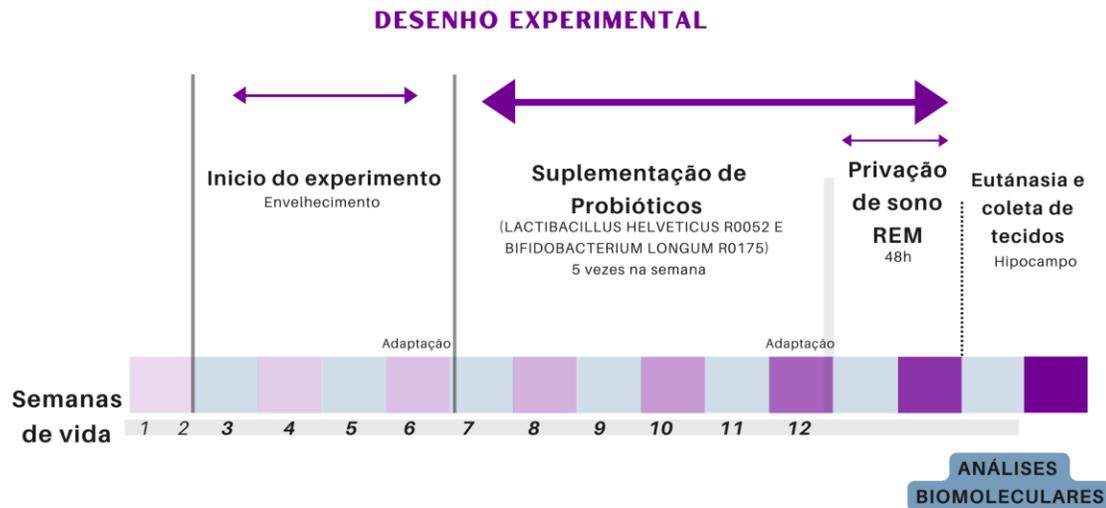


Figura 1 – Desenho experimental

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 200µl da mistura de probióticos, e os grupos controles receberam 200µl de solução salina. Todos os animais passaram por adaptação de 1 semana, com salina.
- **Privação de Sono REM:** A indução de estresse ocorreu através da Privação de Sono Paradoxal (REM) por 48h utilizando o método de plataforma múltipla. 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 estavam habituados à sala de privação de sono, bem como aos seus ambientes experimentais, e tiveram livre acesso à comida e bebida.
- **Western Blotting:** Fragmentos do hipocampo foram coletados para avaliação das proteínas pJNK (sc-6254), NFκB (sc-372), TLR4 (sc-293072) e AKT (sc-271149). Os tecidos foram homogeneizados em tampão de extração a 4°C. O homogeneizado foi centrifugado a 11.000 rpm durante 30 minutos para remover o material insolúvel. O reagente de Bradford foi utilizado para determinar a concentração de proteínas das amostras e depois foi colocado em tampão de Laemmli. Para a análise de imunotransferência, uma quantidade de 30µg de proteínas foi separada em SDS-PAGE e transferida para uma membrana de nitrocelulose, com o auxílio do aparelho Mini-gel

Bio-Rad. As membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos, utilizando como controle endógeno GAPDH (Cell Signaling 1:1000). Após o período de incubação, os anticorpos foram removidos. Então, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário. Após a lavagem, as membranas foram incubadas na solução de revelador Super Signal (Thermo Scientific) e colocadas no fotodocumentador GeneGnomeXRQ-Syngene. O sinal foi detectado por quimioluminescência. A intensidade das bandas foi avaliada por densitometria pelo programa Scion Image (Scion Corporation).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados de peso durante as 6 semanas (Figura 2) foi analisado pelo teste ANOME Two-Way, e do conteúdo proteico (Western blotting) do pJNK, NFkB, TLR4 (Figura 3) foi analisados pelo teste ANOVA One-way, com $p < 0,05$. Todos os grupos não apresentaram diferenças significativas em relação ao peso corporal durante as semanas de suplementação. O protocolo de sono de 48h escolhido não gerou alterações significativas no sistema inflamatório do hipocampo para qualquer grupo, o que impediu a análise dos possíveis benefícios dos probióticos em relação a privação de sono. Nas análises do WB, os grupos CTRL, PROB-PS, CTRL-PS E PROB não apresentaram diferenças estatísticas de conteúdo proteico de TLR4, BDNF e pJNK ($p < 0,05$). Esses resultados revelam que o efeito do consumo crônico de probióticos do tipo Lactobacillus Helveticus R0052 e Bifidobacterium longum R0175 no sistema inflamatório avaliando o conteúdos protéicos de pJNK, NFkB e TLR4 no hipocampo dos camundongos após um evento de privação de sono deve ser mais investigado, utilizando um protocolo de privação de sono diferente e

que ocasione as consequências que eram esperadas, para que assim exista a possibilidade de uma análise dos efeitos dos probióticos.

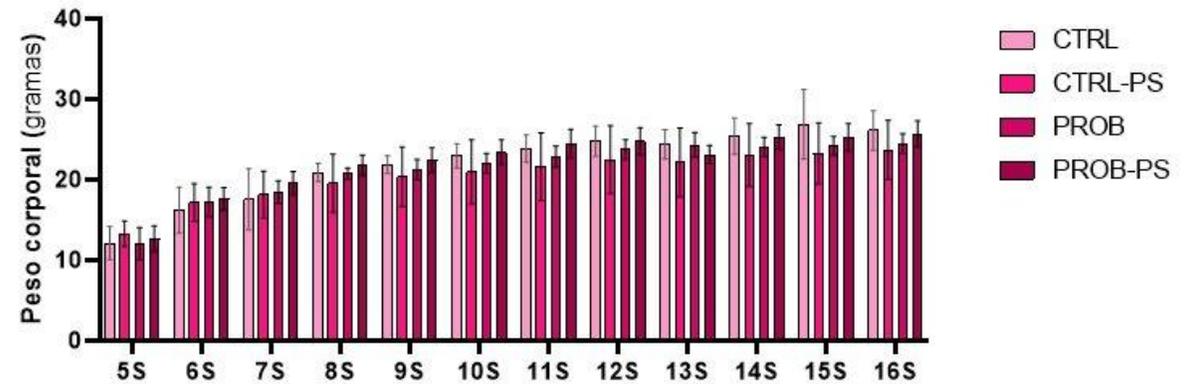


Figura 2 – Peso em gramas

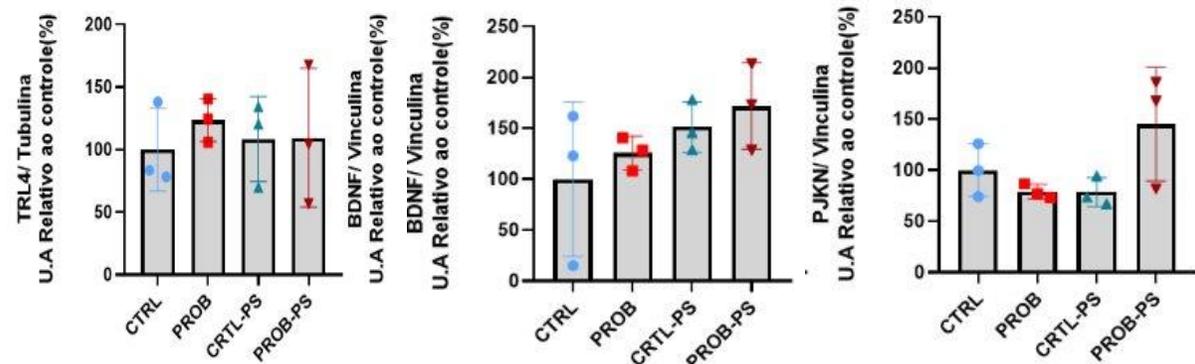


Figura 3– Imagem conteúdo proteico; ANOVA One-Way seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$.

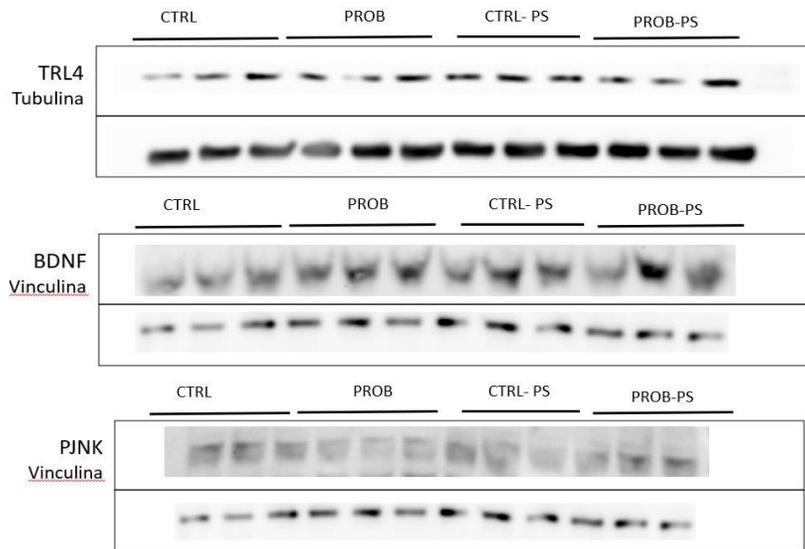


Imagem 4 – Imagem representativa à partir de um conjunto de membranas; Média e erro padrão. ANOVA One-Way seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$.

CONCLUSÕES

Os resultados não mostraram diferenças significativas entre os grupos controle e suplementados na expressão de proteínas inflamatórias como TLR4, p-JNK e NF- κ B. A privação de sono de 48 horas não alterou significativamente o sistema inflamatório do hipocampo. Isso pode ser devido à severidade insuficiente do protocolo de privação ou à duração inadequada da suplementação probiótica. No entanto, a literatura ainda apoia os benefícios dos probióticos na modulação do eixo intestino-cérebro e na redução de marcadores inflamatórios em outras condições. Estudos adicionais são necessários para explorar diferentes durações de privação de sono, períodos de suplementação mais longos e combinações de tratamentos. Este trabalho contribui para a compreensão da relação entre a microbiota intestinal e a saúde cerebral, destacando a necessidade de mais pesquisas sobre o potencial terapêutico dos probióticos no manejo do estresse e na promoção da saúde neurológica.

BIBLIOGRAFIA

- Del'arco, APWT, Magalhães, P, Quilici, FA. (2017). SIM Brasil study –Women's Gastrointestinal Health: gastrointestinal symptoms and impact on the Brazilian women quality of life. **Arq Gastroenterol**,54(2), 115-122.
- Dormir bem: a importância de uma boa noite de sono | Pfizer Brasil.
- Frank MG, Heller HC. A(s) função(ões) do sono. **Handb Exp Pharmacol**. 2019; 253 :3-34.
- Hidalgo-Cantabrana C, Delgado S, Ruiz L, Ruas-Madiedo P, Sanchez B, Margolles A. 2017. Bifidobactérias e seus efeitos promotores da saúde . **Microbiol Spectr** 5 :BAD-0010-2016. doi: 10.1128/microbiolspec.BAD-0010-2016.
- Irwin & Olmstead & Carroll. E. Sleep Disturbance, Sleep Duration, and Inflammation: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies and Experimental Sleep Deprivation. **Biological Psychiatry**, v. 80, n. 1, p. 40–52, jul. 2016.
- Lew LC, Hor YY, Yusoff NAA, Choi SB, Yusoff MSB, Roslan NS, Ahmad A, Mohammad JAM, Abdullah MFIL, Zakaria N, Wahid N, Sun Z, Kwok LY, Zhang H, Liong MT. Probiotic Lactobacillus plantarum P8 alleviated stress and anxiety while enhancing memory and cognition in stressed adults: A randomised, double-blind, placebo-controlled study. **Clin Nutr**. 2019 Oct;38(5):2053-2064. doi: 10.1016/j.clnu.2018.09.010. Epub 2018 Sep 19. PMID: 30266270.
- Liang S & Wang T & Hu X & Luo J & Li W & Wu X & Duan Y & Jin F. Administration of Lactobacillus helveticus NS8 improves behavioral, cognitive, and biochemical aberrations caused by chronic restraint stress. **Neuroscience**.
- Liu YW, Liu WH, Wu CC, Juan YC, Wu YC, Tsai HP, Wang S, Tsai YC. Psychotropic effects of Lactobacillus plantarum PS128 in early life-stressed and naïve adult mice. **Brain Res**.
- Ozan,ZT, Tanik,N, Inan,LE.(2019).Constipation is associated with tension type headache in women. **Arq Neuropsiquiatr**,77(3), 161-165.
- Scharon, J. *Imunologia Básica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000. 267p.
- Souza, P.R. Participação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal na doença inflamatória intestinal induzida experimentalmente. 2015. 125f. **Tese (Doutorado)**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.
- Síle M. Griffin, Markus J. Lehtinen, Johann Meunier, Laura Ceolin, Francois J. Roman & Elaine Patterson (2023) Restorative effects of probiotics on memory impairment in sleep-deprived mice, **Nutritional Neuroscience**, 26:3, 254-264.
- Slykerman RF, Li E, Mitchell EA. Probiotics for Reduction of Examination Stress in Students (PRESS) study: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of the probiotic Lactocaseibacillus rhamnosus HN001.
- Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ. Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options. **J Physiol Pharmacol**. 2011;62(6):591-599.
- Wang, Z. et al. Alterations of the Gut Microbiota in Response to Total Sleep Deprivation and Recovery Sleep in Rats. **Nature and Science of Sleep**, v. Volume 14, p. 121–133, jan. 2022.