



## **EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE PROBIÓTICOS *Lactobacillus helveticus* R0052 E *Bifidobacterium longum* R0175 NA MEMÓRIA E PARÂMETROS INTESTINAIS DE CAMUNDONGOS PRIVADOS DE SONO**

**Palavras-Chave:** Memória de reconhecimento; Privação de sono; Fator neurotrófico derivado do cérebro.

**Autoras:**

**Gabriela Zamariam Pierro, FCA – UNICAMP**  
**Maria Laysa Capistrano da Silva, FCA – UNICAMP**  
**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Beatriz da Silva Franco (coorientadora), FCA - UNICAMP**  
**Mestrando Vanderson Douglas Rocha, FCA – UNICAMP**  
**Doutoranda Giovanna Alexandre Fabiano, FCA – UNICAMP**  
**Pós doutoranda Camila Cristina Alves Machado, CCB – UEL**  
**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adriana Souza Torsoni, FCA – UNICAMP**  
**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adriane Elisabete Costa Antunes, FCA – UNICAMP**  
**Prof. Dr. Eduardo José de Almeida Araújo, CCB – UEL**  
**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Andrea Maculano Esteves (orientadora), 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).

O sono REM tem forte relação com a consolidação da memória, como abordado no estudo de Fisbein, Kastaniotis e Chattman (1974) em que o aprendizado induz um aumento prolongado de sono paradoxal (REM). Já a privação do sono REM quando observada, pode ser relacionada a déficits de memória e cognição (Cousins; Fernández, 2019).

A privação de sono pode causar diminuição nos níveis de BDNF (Brain-derived Neurotrophic Factor) no cérebro (Schmitt; Holsboer-Trachsler; Eckert, 2016). O BDNF age como proteção neuronal na região hipocampal (inclusive durante o sono), além de poder apresentar uma resposta inicial contra o estresse e ser associado à alterações de memória e comportamento (Vigers et al., 2012).

Longos períodos de privação de sono reduzem a resposta antioxidante no cérebro e em outros órgãos (Atrooz; Salim, 2020), inclusive no intestino (Zhao et al., 2022). A percepção do estresse (como a privação de sono) se faz vinculada ao aumento da inflamação entérica, que impacta na morfologia dos órgãos afetados, como apresentado no estudo de Schneider et al. (2020) em que o estresse psicológico aumentou significativamente a inflamação intestinal.

Apesar da alteração da estrutura de órgãos impactados pela privação de sono, estudos acerca da ação dos probióticos indicam uma possível restauração da barreira mecânica intestinal (Gou et al., 2022). A suplementação probiótica também demonstrou ser eficiente no aumento da secreção de muco intestinal (Caballero-Franco et al., 2007), que contém componentes como peptídeos

antimicrobianos (AMPs), ligados à estimulação da regeneração tecidual, resposta imune e ação anti inflamatória (Bakshani et al., 2018).

Diversos estudos realizados com a premissa da modulação da microbiota através da suplementação probiótica e prebiótica mostraram que seu uso crônico pode reduzir danos na memória e homeostase fisiológica, provocados pela privação do sono (Long-Smith et al., 2020; Chung et al., 2023; Griffin et al., 2023), fortalecendo seu papel como possível alvo terapêutico.

A associação dos probióticos *Lactobacillus helveticus* R0052 e *Bifidobacterium longum* R0175 pode ser alvo terapêutico através do eixo intestino-cérebro, agindo de forma ansiolítica e prevenindo neurogênese hipocampal e as alterações na plasticidade sináptica causada por estresse (Ait-Belgnaoui et al., 2014). Além disso, o estudo de Mohammadi et al. (2019) demonstrou que as mesmas cepas probióticas em conjunto podem reduzir o prejuízo nos níveis de BDNF no nível molecular causados por estresse induzido por lipopolissacarídeo em ratos, podendo indicar uma possível redução no déficit de memória por consequência.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta da suplementação dos probióticos *Lactobacillus helveticus* R0052 e *Bifidobacterium longum* R0175 análoga à privação do sono REM em camundongos C57 na manutenção da memória de reconhecimento (teste de reconhecimento de objetos), comportamento locomotor e ansiedade (open field), níveis de BDNF presentes no hipocampo (elisa indireto) e alteração da população neuronal entérica (imunofluorescência indireta) na medida em que o estresse seja induzido.

## **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 (CEUA: 6242-1/2023). 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.

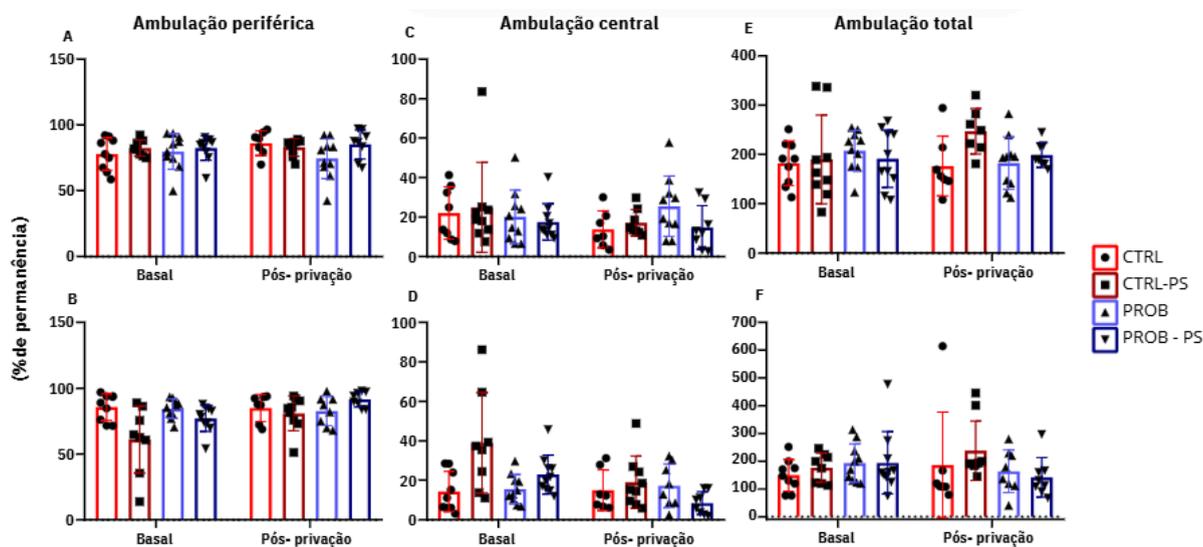


**Figura 1.** Delineamento experimental. Legenda: REC- teste de reconhecimento de objetos; Cx Atv- teste de caixa de atividade.

## 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 ou nos quadrantes centrais. Além disso, o número total de entradas em quadrantes foi contabilizado.

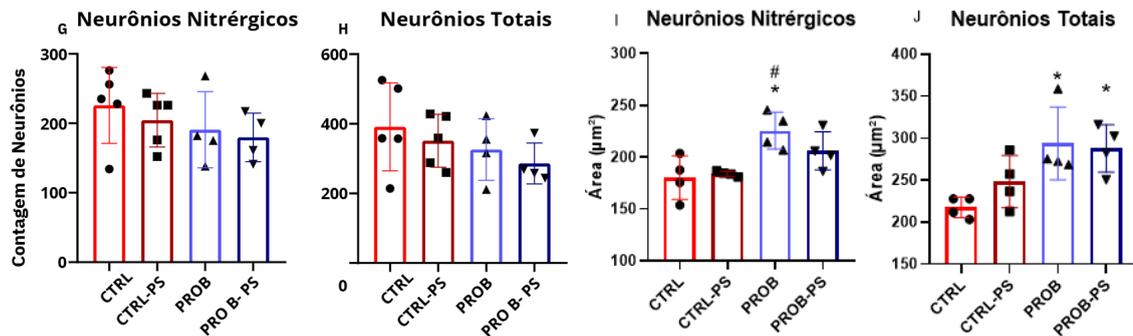
Na Caixa de Atividade (Open Field), a ambulação periférica, ambulação central e ambulação total, foram analisados pelo modelo Misto com post hoc Tukey ( $p < 0,05$ ), onde foi realizada a análise de interação Grupo x Tempo. Nenhuma diferença significativa foi encontrada para ambulação periférica ( $F(3,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



**Figura 1.** Porcentagem do tempo de permanência na periferia (A e B) e centro (C e D) e número de quadrado totais percorridos (E e F) na caixa de atividade (Open Field) realizado antes da privação (basal) e pós-privação de sono de 48 horas. Os gráficos A, C e E são referentes aos primeiros 5 minutos de teste, enquanto os gráficos B, D e F aos últimos 5 minutos. Dados apresentados em valores individuais, médias e desvio padrão, ( $n = 7-10$ ). Os dados foram analisados pelo Modelo Misto, com post hoc Tukey ( $p < 0,05$ ).

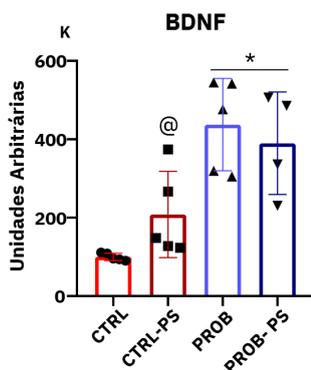
A quantidade e área dos neurônios nitrérgicos e totais foram obtidos através do método de imunofluorescência indireta, realizados no jejuno. Para a análise da densidade populacional de neurônios, foram capturadas 32 imagens em campos consecutivos, utilizando-se a objetiva de 20x

resultando em uma área de análise de 0,0448 cm<sup>2</sup> das regiões intermediárias da circunferência intestinal. A contagem de neurônios foi realizada com o auxílio do analisador de imagens Image Pro Plus<sup>®</sup>. Além disso, um total de 100 corpos celulares de neurônios totais e de cada subpopulação avaliada foi mensurado com auxílio do mesmo software.



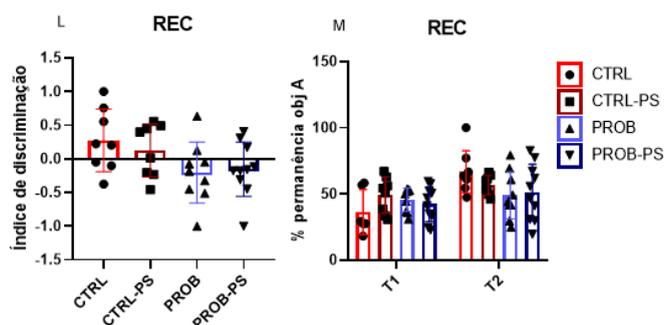
**Figura 2.** Contagem de neurônios nitrérgicos (G) e totais (H) presentes no jejuno obtidos através da análise de Imunofluorescência Indireta. Dados apresentados em valores individuais, médias e desvio padrão, (n=7-10). Área (µm<sup>2</sup>) de neurônios nitrérgicos (I) e totais (J) presentes no jejuno obtidos através da análise de Imunofluorescência Indireta. Legenda: \* difere de CTRL (PROB (I)- p= 0.0105; PROB (J)- p=0.0199 e PROB-PS (J)- p= 0.325); # difere de CTRL-PS (p=0.0184). Dados apresentados em valores individuais, médias e desvio padrão, (n=4). Os dados foram analisados pelo Modelo Misco, com post hoc Tukey (p<0,05).

Os níveis de BDNF foram obtidos através do método Elisa Indireto, no hipocampo.



**Figura 3.** Níveis de BDNF (K) obtidos do hipocampo através do método de Elisa Indireto. Legenda: \* difere de CTRL (PROB- p= 0,0005 e PROB-PS p= 0,0035); @ difere de PROB (p=0,0135). 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).

O TRO foi realizado conforme Leger et al. (2013), iniciando com habituação de 2 minutos, 24h antes do teste. Após esse período, os animais passaram por duas etapas com 1 minuto de intervalo: familiarização com dois objetos idênticos (exploração de 20 segundos em até 10 minutos) e, em seguida, teste com um objeto trocado. A exploração foi considerada quando o camundongo cheirava ou tocava o objeto a até 2 cm, desconsiderando mastigar ou escalar. O teste foi feito após a privação de sono para os grupos PS, sempre no mesmo horário. A maior exploração do objeto novo indicaria melhor memória de curto prazo nos grupos PROB.



**Figura 4.** Índice de discriminação (L) e % de permanência no objeto A (objeto alterado) (M) do teste de reconhecimento de objetos. Dados apresentados em valores individuais, médias e desvio padrão, (n=6-10 e 8-10 respectivamente). Os dados foram analisados pelo Modelo Misto, com post hoc Tukey.

## CONCLUSÕES

Embora não tenhamos observado diferenças no Open Field, no reconhecimento de objetos ou na contagem global de neurônios entéricos do jejuno com esse protocolo experimental, a suplementação probiótica destacou-se por elevar significativamente os níveis de BDNF no hipocampo, mesmo sob privação de sono, indicando um promissor efeito neuroprotetor. Além disso, a análise morfológica do jejuno revelou aumento na densidade das populações de neurônios totais e nitrérgicos nos grupos suplementados, reforçando o potencial benéfico da cepa tanto para a saúde intestinal quanto para a função neural central.

## 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>.
- ATROOZ, F.; SALIM, S. Sleep deprivation, oxidative stress and inflammation. Em: *Inflammatory Disorders, Part A*. [s.l.] Elsevier, 2020. v. 119p. 309–336.
- BAKSHANI, C. R. et al. Evolutionary conservation of the antimicrobial function of mucus: a first defence against infection. *NPJ biofilms and microbiomes*, v. 4, n. 1, p. 1–12, 2018.
- CABALLERO-FRANCO, C. et al. The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, v. 292, n. 1, p. G315–G322, 2007.
- 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.
- COUSINS, J. N.; FERNÁNDEZ, G. The impact of sleep deprivation on declarative memory. *Progress in brain research*, v. 246, p. 27–53, 2019.
- FISHBEIN, W.; KASTANIOTIS, C.; CHATTMAN, D. Paradoxical sleep: prolonged augmentation following learning. *Brain research*, v. 79, n. 1, p. 61–75, 1974.
- GOU, H.-Z. et al. How do intestinal probiotics restore the intestinal barrier? *Frontiers in microbiology*, v. 13, 2022.
- 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, 2023. 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.
- LEGER, M. et al. Object recognition test in mice. *Nature protocols*, v. 8, n. 12, p. 2531–7, 2013.
- LONG-SMITH, C. et al. Microbiota-gut-brain axis: New therapeutic opportunities. *Annual review of pharmacology and toxicology*, v. 60, n. 1, p. 477–502, 2020.
- MOHAMMADI, G. et al. The effects of probiotic formulation pretreatment (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) on a lipopolysaccharide rat model. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 38, n. 3, p. 209–217, 2019. DOI 10.1080/07315724.2018.1487346.
- 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.
- SCHNEIDER, K. M. et al. The enteric nervous system relays psychological stress to intestinal inflammation. *Cell*, v. 186, n. 13, p. 2823–2838.e20, 2023.
- SCHMITT, K.; HOLSBOER-TRACHSLER, E.; ECKERT, A. BDNF in sleep, insomnia, and sleep deprivation. *Annals of medicine*, v. 48, n. 1–2, p. 42–51, 2016.
- VIGERS, A. J. et al. Sustained expression of brain-derived neurotrophic factor is required for maintenance of dendritic spines and normal behavior. *Neuroscience*, v. 212, p. 1–18, 2012. DOI 10.1016/j.neuroscience.2012.03.031.
- ZHAO, N. et al. Intestinal dysbiosis mediates cognitive impairment via the intestine and brain NLRP3 inflammasome activation in chronic sleep deprivation. *Brain, behavior, and immunity*, v. 108, p. 98–117, 2022.