

O TRATAMENTO PER SE COM BACTÉRIAS DA ESPÉCIE *LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM* INFLUENCIA NO DESENVOLVIMENTO DA PREFERÊNCIA CONDICIONADA POR LUGAR E NA INDUÇÃO POR ÁLCOOL EM CAMUNDONGOS

Kallyane Santos Oliveira Silva¹, Thaísa Barros dos Santos², Isa Raphaela Santos Rodrigues¹, Jacques Robert Nicoli³, Ana Paula Trovatti Uetanabaro⁴, Alexandre Justo de Oliveira Lima⁵, Eduardo Ary Villela Marinho⁵, Eduardo Koji Tamura^{5,6}

¹Discentes do Curso de Biomedicina (UESC); ²Doutoranda em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos (UESC); ³Docente do Dep. de Microbiologia (UFMG); ⁴Docente do Dep. de Ciências Biológicas (UESC); ⁵Docentes do Departamento de Ciências da Saúde (UESC); ⁶Orientador.

Resumo

A influência do eixo microbiota-intestino-cérebro sob saúde mental e alterações comportamentais tem sido fortemente descrita na literatura. O objetivo deste trabalho foi avaliar se cepas de *Lactiplantibacillus plantarum* (Lp286; Lp81) são capazes de promover preferência condicionada por lugar (PCL) e/ou influenciar a PCL induzida por álcool em camundongos Swiss. No experimento 1, a PCL foi realizada com animais tratados apenas com LP286 ou Lp81. No experimento 2 a PCL foi induzida com álcool (ou veículo) e os animais tratados em outro período com veículo, Lp286 ou Lp81. Os testes foram filmados e analisados via software Anymaze® quanto ao escore do tempo de permanência, nº de entradas e distância percorrida. Os resultados sugerem que Lp286 e Lp81 não desenvolvem PCL. Além disso, Lp81 impediu a PCL induzida por álcool. Os achados reforçam uma comunicação bidirecional intestino-cérebro, entre bactérias potencialmente psicobióticas e comportamentos relacionados ao uso de substâncias.

Autorização legal: CEUA-UESC; protocolo nº 003/20

Palavras-chave: Probióticos; Microbiota; Comportamento

Apoio financeiro: FAPESB, CAPES, CNPq e ICB/UESC.

Trabalho selecionado para a JNIC: UESC

Introdução

O eixo microbiota-intestino-cérebro tem ganhado cada vez mais destaque nos campos da microbiologia e neurociência. Nesse sentido, acredita-se que a microbiota residente possa exercer considerável influência sobre o comportamento do hospedeiro (Cryan et al., 2019). Ademais, estudos revelam que a interação bidirecional entre a microbiota intestinal e o cérebro pode ser modulada por probióticos, prebióticos, simbióticos e dietas com impactos benéficos na atividade e no comportamento do cérebro (Liu et al., 2015). Um estudo de Bharwani et al. (2017) sugere que *L. rhamnosus* atenua déficits comportamentais e alterações imunológicas no estresse social crônico. Além disso, os probióticos secretam uma ampla gama de sinalizadores que por vias distintas exercem seus efeitos, seja antidepressivo, imunomodulador ou neuromodulador (Luan et al., 2019). Notavelmente, *Lactiplantibacillus*, um gênero probiótico proeminente, produz múltiplos neurotransmissores, que auxiliam na manutenção de funções cerebrais adequadas (Yong et al., 2020).

Bactérias intestinais também interferem no desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos (González-Arancibia et al., 2019), como no desenvolvimento da dependência ao álcool (Leclercq et al., 2014). Em consonância, Xiao et al. (2018) mostraram que a administração crônica de álcool em camundongos reduz o número de lactobacilos na microbiota intestinal. Dada a capacidade das bactérias intestinais de influenciar o funcionamento de órgãos como o cérebro, a microbiota intestinal é considerada um alvo potencial de intervenções preventivas ou terapêuticas na dependência do álcool (Leclercq et al., 2019).

Parte do conhecimento atual, acerca dos mecanismos de ação neurobiológicos no processo da dependência, foi resultante de estudos envolvendo animais como sujeitos experimentais (Santos, 2018). Entre estes modelos, o paradigma de preferência condicionada por lugar (PCL) é o principal para estudar as interações entre efeitos de drogas e pistas contextuais (Tzschenke, 2007; Van der Kooy, 1987). Diante das informações supracitadas, o presente estudo buscou verificar se as cepas *L. plantarum* 286 e *L. plantarum* 81 são capazes de promover a PCL e se estas cepas são capazes de influenciar o desenvolvimento da PCL induzida por álcool em camundongos Swiss.

Metodologia

I. Obtenção e manutenção das cepas

Foram utilizadas duas cepas de *L. plantarum* com potencial probiótico, LP286 e LP81 obtidas a partir da fermentação espontânea de cacau e cupuaçu, respectivamente. As cepas foram armazenadas e preparadas em soluções contendo 10⁹ (UFC/mL, salina 0,85% + leite desnatado 15%), conforme descrito em Barros-Santos et al. (2020).

II. Animais e Tratamentos

Foram utilizados 48 camundongos Swiss machos obtidos do biotério da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Os animais foram alojados no Lab. de Farmacologia Comportamental (LAFAC) da UESC e separados em grupos de 8 animais (ciclo claro/escuro 12/12h, água e comida *ad libitum*, 23±1°C). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UESC (CEUA-UESC; 012/2017).

III. Preferência Condicionada por Lugar (PCL)

O modelo utiliza um aparato composto por 3 compartimentos distintos, separados por portas removíveis. O compartimento central (10 cm x 15 cm x 40 cm) é pintado de branco e constitui a passagem para os outros dois compartimentos principais maiores (20x20x40 cm), sendo um ambiente nomeado como preto, com faixas brancas e pretas verticais nas paredes e um tapete verde no piso; e o outro (branco) diferenciado com faixas brancas e pretas horizontais nas paredes e um tapete vermelho com textura diferente.

O protocolo experimental apresenta 4 fases alternadas por 24 h:

1 – Habituação: animais colocados no centro aparato, com livre acesso aos compartimentos (10 min, 1x/dia, 2 dias);

2 – Pré-condicionamento: expostos ao centro do aparelho, com livre circulação (15 min), para analisar se há preferência por um dos compartimentos (exposição única);

3 – Condicionamento: **Exp. 1:** em dias ímpares os animais receberam veículo ou veículo + Lp286 (10^9 UFC) ou veículo + Lp81 (10^9 UFC) por via oral (v.o.) e pareados ao ambiente branco e em dias pares receberam veículo (v.o.) e pareados ao ambiente preto. Os animais foram mantidos por 10 min ao longo de 8 dias. **Exp. 2:** também com duração de 8 dias, os animais receberam álcool (v.o.) em dias ímpares e pareados ao branco, nos dias pares receberam veículo e pareados ao preto. Neste experimento, durante esta fase também receberam Lp286 ou Lp81 (em outro período);

4 – Pós-condicionamento: os animais foram expostos ao centro do aparato, com livre acesso aos ambientes (15 min), para observar se as cepas foram capazes de promover PCL (Exp. 1) ou se são capazes de influenciar a PCL induzida por álcool (Exp. 2).

Todos os testes foram filmados e analisados com o software Anymaze® quanto aos escores do tempo de permanência (TPC), número de entradas (NEC) e distância percorrida (DPC) nos compartimentos. O escore é a subtração do dado associado ao compartimento cepa menos o veículo (Exp.1) e do compartimento álcool menos o veículo (Exp. 2). Os dados foram apresentados como média±erro padrão da média (EPM) e a Análise de Variância (ANOVA) e teste post hoc de Bonferroni foram usados nas análises, considerando a probabilidade de 95% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Experimento 1

▪

Os testes pré e pós para TPC (Fig. 1A), NEC (Fig. 1B) e DPC (Fig. 1C) indicam que não houve desenvolvimento da PCL, isto é, as cepas potencialmente psicobióticas não são capazes de promover o efeito recompensador quando administradas *per se*.

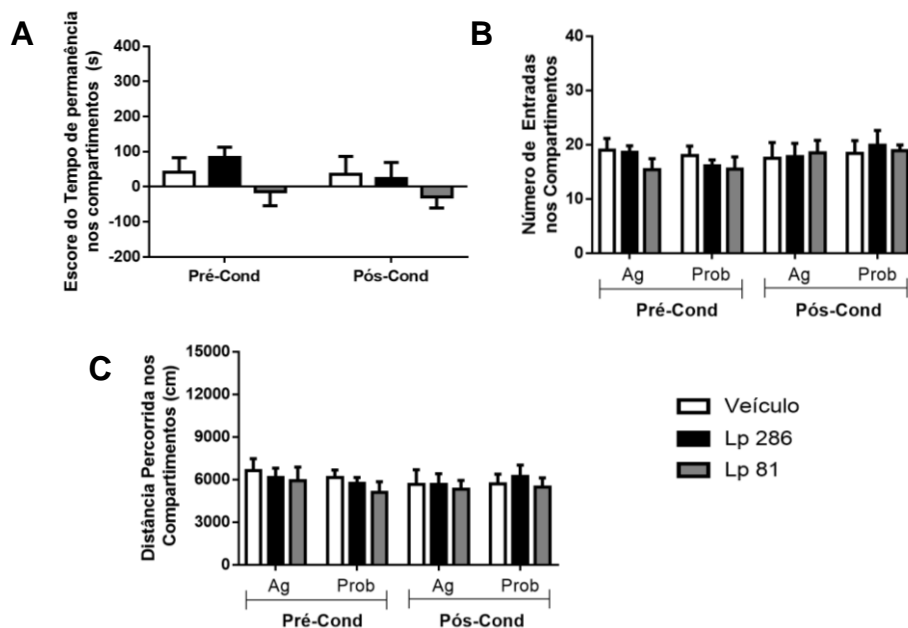


Fig. 1. Escore do tempo de permanência (TPC, A), número de entradas (NEC, B) e distância percorrida (DPC, C) nos compartimentos.

Experimento 2

A análise do escore do tempo de permanência nos compartimentos (Figura 2A) demonstra que o álcool induz a PCL, já que houve diferença entre o pré e pós-condicionamento no grupo veículo [$p=0,0037$], o que não aconteceu no grupo Lp 81 [$p>0,9999$], indicando que o tratamento com Lp 81 foi capaz de inibir o desenvolvimento da PCL induzido por álcool. Não foram observadas diferenças entre os grupos nos parâmetros NEC (Fig. 2A) e DPC (Fig. 2B).

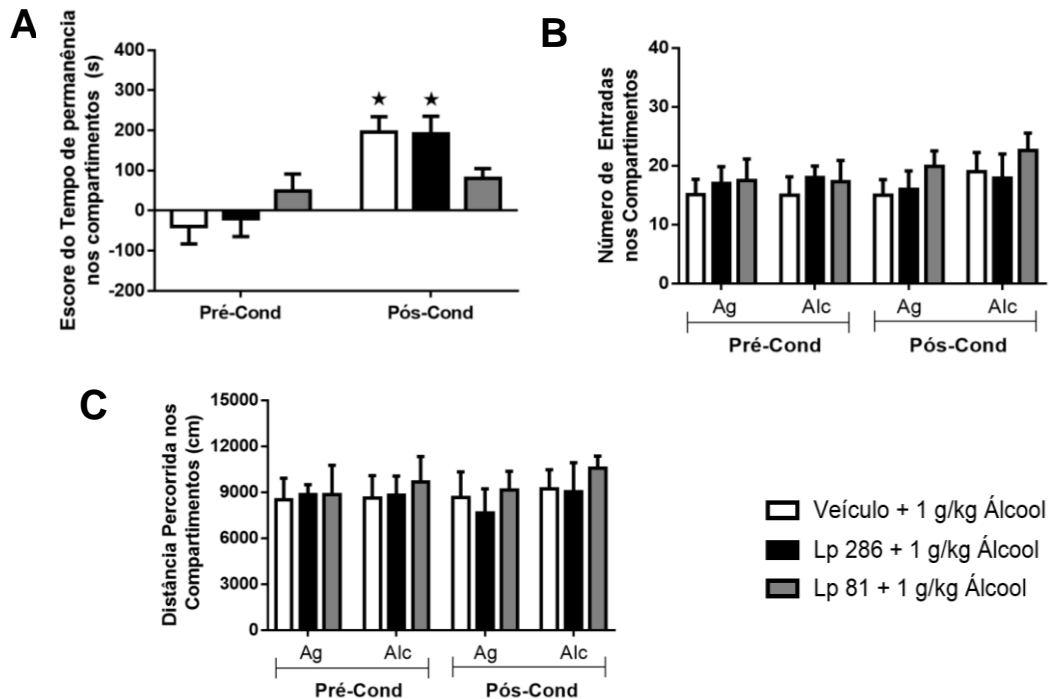


Fig. 2. Escore do tempo de permanência (TPC, A), número de entradas (NEC, B) e distância percorrida (DPC, C) nos compartimentos. ★Indica diferença entre o pré e pós-condicionamento dos grupos veículo e Lp 286.

McKendrick and Graziane (2020) sugerem que o potencial abusivo de uma substância pode ser observado a partir do desenvolvimento da preferência condicionada por lugar (PCL). Sob essa perspectiva, os nossos resultados sugerem que as cepas potencialmente probióticas não são capazes de promover o efeito recompensador na PCL quando administradas *per se*. Além disso, o presente estudo indica que o tratamento com a cepa Lp81 inibiu o desenvolvimento do comportamento de PCL induzida por álcool nas condições testadas. Portanto, infere-se que a cepa Lp81 possui potencial psicobiótico, corroborando com dados de Barros-Santos et al. (2020), que sugere que as cepas Lp81 e Lp286 são capazes de promover efeitos psicobióticos ao reduzir comportamentos associados à ansiedade e depressão também em camundongos Swiss.

Conclusões

Tomados em conjunto, os dados sugerem uma interação significativa entre o eixo microbiota-intestino-cérebro uma vez que o tratamento com a cepa Lp81 inibiu o desenvolvimento do comportamento de PCL induzida por álcool nas condições testadas. Em suma, a cepa Lp81 merece ser melhor estudada e, caso o potencial psicobiótico seja confirmado, poderá atuar como adjuvante preventivo ou terapêutico nos comportamentos associados ao uso de álcool no futuro.

Referências bibliográficas

- Barros-Santos, T., Silva, K.S.O., Libarino-Santos, M., Elisângela Gouveia Cata-Preta, Reis, H.S., Tamura, E.K., de Oliveira-Lima, A.J., Berro, L.F., Uetanabaro, A.P.T., Marinho, E.A.V., 2020. Effects of chronic treatment with new strains of *Lactobacillus plantarum* on cognitive, anxiety- and depressive-like behaviors in male mice. *PLoS One* 15, e0234037. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234037>
- Bharwani, A., Mian, M.F., Surette, M.G., Bienenstock, J., Forsythe, P., 2017. Oral treatment with *Lactobacillus rhamnosus* attenuates behavioural deficits and immune changes in chronic social stress. *BMC Med.* 15, 7. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0771-7>
- Cryan, J.F., O'Riordan, K.J., Cowan, C.S.M., Sandhu, K. V., Bastiaanssen, T.F.S., Boehme, M., Codagnone, M.G., Cusotto, S., Fulling, C., Golubeva, A. V., Guzzetta, K.E., Jaggar, M., Long-Smith, C.M., Lyte, J.M., Martin, J.A., Molinero-Perez, A., Moloney, G., Morelli, E., Morillas, E., O'Connor, R., Cruz-Pereira, J.S., Peterson, V.L., Rea, K., Ritz, N.L., Sherwin, E., Spichak, S., Teichman, E.M., van de Wouw, M., Ventura-Silva, A.P., Wallace-Fitzsimons, S.E.,

- Hyland, N., Clarke, G., Dinan, T.G., 2019. The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol. Rev.* 99, 1877–2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>
- González-Arancibia, C., Urrutia-Piñones, J., Illanes-González, J., Martínez-Pinto, J., Sotomayor-Zárate, R., Julio-Pieper, M., Bravo, J.A., 2019. Do your gut microbes affect your brain dopamine? *Psychopharmacology (Berl)*. 236, 1611–1622. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05265-5>
- Leclercq, S., Matamoros, S., Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Jamar, F., Stärkel, P., Windey, K., Tremaroli, V., Bäckhed, F., Verbeke, K., de Timary, P., Delzenne, N.M., 2014. Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E4485–E4493. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415174111>
- Leclercq, S., Stärkel, P., Delzenne, N.M., de Timary, P., 2019. The gut microbiota: A new target in the management of alcohol dependence? *Alcohol* 74, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2018.03.005>
- Liu, X., Cao, S., Zhang, X., 2015. Modulation of Gut Microbiota–Brain Axis by Probiotics, Prebiotics, and Diet. *J. Agric. Food Chem.* 63, 7885–7895. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02404>
- Luan, H., Wang, X., Cai, Z., 2019. Mass spectrometry- based metabolomics: Targeting the crosstalk between gut microbiota and brain in neurodegenerative disorders. *Mass Spectrom. Rev.* 38, 22–33. <https://doi.org/10.1002/mas.21553>
- McKendrick, G., Graziane, N.M., 2020. Drug-Induced Conditioned Place Preference and Its Practical Use in Substance Use Disorder Research. *Front. Behav. Neurosci.* 14, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.582147>
- Santos, M. L.; Efeitos do tratamento repetido e combinado de aripiprazol e topiramato sobre preferência condicionada por lugar induzida pelo etanol ou metilfenidato em camundongos. Ilhéus: Universidade Estadual de Santa Cruz, 2018. 19. p
- Tzschentke, T.M., 2007. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict. Biol.* 12, 227–462. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2007.00070.x>
- van der Kooy, D., 1987. Place Conditioning: A Simple and Effective Method for Assessing the Motivational Properties of Drugs, in: *Methods of Assessing the Reinforcing Properties of Abused Drugs*. Springer New York, New York, NY, pp. 229–240. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4812-5_13
- Xiao, H., Ge, C., Feng, G., Li, Y., Luo, D., Dong, J., Li, H., Wang, H., Cui, M., Fan, S., 2018. Gut microbiota modulates alcohol withdrawal-induced anxiety in mice. *Toxicol. Lett.* 287, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.01.021>
- Yong, S.J., Tong, T., Chew, J., Lim, W.L., 2020. Antidepressive Mechanisms of Probiotics and Their Therapeutic Potential. *Front. Neurosci.* 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01361>