



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

ESTELA ALVES BATISTA

**Efeito sexo-dependente da ingestão de kombucha em
modelo de comportamento tipo depressivo/ansioso
induzido por LPS em camundongos**

VITÓRIA, ES

2022

Estela Alves Batista

Efeito sexo-dependente da ingestão de kombucha em modelo de comportamento tipo depressivo/ansioso induzido por LPS em camundongos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientador(a): Prof^a. Dra Cristina Martins e Silva

Co-orientador(a): Prof^a Dra. Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves

VITÓRIA, ES

2022

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

B333e Batista, Estela Alves, 1984-
Efeito sexo-dependente da ingestão de kombucha em modelo de comportamento tipo depressivo/ansioso induzido por LPS em camundongos / Estela Alves Batista. - 2022.
83 f. : il.

Orientadora: Cristina Martins e Silva.

Coorientadora: Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Neurociências. 2. Depressão mental. 3. Fitoquímicos. 4. Bioquímica. I. Silva, Cristina Martins e. II. Gonçalves, Juliana Barbosa Coitinho. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

Estela Alves Batista

“Efeito sexo-dependente da ingestão de Kombucha em modelo de comportamento tipo depressivo/ansioso induzido por LPS em camundongos”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Aprovado(a) em 31 de janeiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Cristina Martins e Silva – Orientadora

Prof^a. Dr^a. Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves – Coorientadora

Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães – Examinador Interno

Prof^a. Dr^a. Vanessa Beijamini Harres – Examinador Externo

**Vitória/ES
2021**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
VANESSA BEIJAMINI HARRES - SIAPE 1489959
Departamento de Ciências Farmacêuticas - DCFA/CCS
Em 01/02/2022 às 11:26

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/351238?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
MARCO CESAR CUNEGUNDES GUIMARAES - SIAPE 2622289
Departamento de Morfologia - DM/CCS
Em 03/02/2022 às 16:24

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/353199?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
JULIANA BARBOSA COITINHO GONCALVES - SIAPE 2077211
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 07/02/2022 às 14:03

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/354848?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
CRISTINA MARTINS E SILVA - SIAPE 1808073
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 07/02/2022 às 14:14

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/354858?tipoArquivo=O>

AGRADECIMENTOS

A minha família, pelo amor incondicional, compreensão e paciência nos momentos difíceis, pelo incentivo e apoio. Principalmente a minha mãe Lúcia, meu irmão Jackson, minha cunhada Jenifer e até meus cachorrinhos Max, Clara, Emma e Pingo, que me acompanharam até a UFES e aguardaram por várias vezes quando precisei estar presente aos finais de semana e horários noturnos. Sem vocês, não teria conseguido chegar até aqui!

À minha orientadora Cristina e co-orientadora Juliana pela confiança, orientação, ensinamentos, amizade e incentivo de todos esses anos. Serei eternamente grata!

Aos colegas do LabNec e LNMC com os quais pude conviver durante o mestrado, em especial Daniella, Julyane, Alessandra e Matheus, obrigada pelo convívio, discussões e troca de conhecimentos, auxílio nos experimentos, momentos de amizade e descontração, a ajuda de vocês foi essencial!

Aos demais colegas e funcionários do programa de pós-graduação de bioquímica por todo apoio, auxílio e agradável convivência.

Um agradecimento especial à Tamara, que renunciou a vários finais de semana e feriados para me ajudar com os experimentos e sempre esteve por perto me auxiliando e ensinando em todos os momentos dessa jornada, e se tornou uma querida amiga ao longo desse processo.

A professora Lívia que gentilmente cedeu a sala de comportamento para realização dos meus experimentos. Aos professores do programa da pós-graduação de bioquímica que sempre me receberam de braços abertos, pelos ensinamentos, auxílios e discussões em disciplinas.

Ao Jovan da empresa Kombucha Viva o Dia pelo apoio e parceria no fornecimento da kombucha utilizada neste trabalho; e a Rosana e Amanda da USP pela parceria na caracterização físico-química das amostras de kombucha.

Ao LABIOM por todo auxílio durante o longo processo de liofilização das minhas amostras.

A CAPES e FAPES pelo apoio financeiro.

A banca examinadora que aceitou cordialmente o convite.

A UFES pelo ensino gratuito e de qualidade.

A todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização desta etapa.

RESUMO

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é um distúrbio psiquiátrico com alta prevalência, e de origem multifatorial, e o sistema imunológico pode estar envolvido nas alterações que levam a esta desordem. Os medicamentos antidepressivos representam a principal forma de tratamento para o TDM, porém, possuem sua eficácia limitada, em torno de 1/3 dos pacientes respondem ao tratamento com esses fármacos, o que torna necessário o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para esta desordem. O modelo pré-clínico de indução de citocinas inflamatórias através do lipopolissacarídeo (LPS) mostra o papel da neuroinflamação em desencadear comportamentos do tipo depressivo. A kombucha (KT), uma bebida fermentada à base de chá da planta *Camelia Sinensis*, vem sendo considerada uma boa candidata em trazer benefícios à saúde mental através da regulação imune. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial neuromodulador da KT sobre o comportamento tipo depressivo/ansioso induzido pelo LPS. Para isto, foram utilizados camundongos machos e fêmeas tratados com KT (na dose de 2mg/kg durante 10 dias) e submetidos ao modelo de comportamento tipo depressivo induzido por LPS (0,83 mg/kg i.p). Após 24 horas da administração do LPS, os animais foram submetidos aos testes comportamentais: campo aberto, caixa claro e escuro e teste de suspensão da cauda. Os resultados encontrados demonstram que a KT tem potencial de reverter o comportamento tipo depressivo e atenuar o comportamento tipo ansioso e a hipolocomoção causados pelo LPS em fêmeas. Nos machos, por sua vez, não foi observado o mesmo efeito do consumo dessa bebida nos parâmetros de comportamento tipo ansioso e campo aberto. Ademais, nos machos o LPS não provocou aumento da imobilidade no teste de suspensão da cauda. Diante disto, sugere-se que o consumo de KT tem efeitos benéficos na modulação de comportamento tipo depressivo/ansioso em fêmeas, e que elas são mais sensíveis às alterações comportamentais induzidas por LPS.

Palavras-chave: Transtorno Depressivo Maior (TDM), kombucha, lipopolissacarídeo, comportamento tipo depressivo.

ABSTRACT

Major Depressive Disorder (MDD) is a highly prevalent psychiatric disorder of multifactorial origin, and the immune system may be involved in the changes that lead to this pathology. Antidepressant drugs represent the principal form of treatment for MDD; however, their efficacy is limited, around 1/3 of patients respond to treatment with these drugs, which makes necessary to develop new therapeutic approaches for this disorder. The preclinical model of induction of inflammatory cytokines through lipopolysaccharide (LPS) shows the role of neuroinflammation in triggering depressive-like behaviors. Kombucha (KT), a fermented beverage made with *Camelia Sinensis*, has been considered a good candidate for enhancing mental health through immune regulation. Thus, this study aimed to evaluate the neuromodulatory potential of KT on LPS-induced depressive/anxious-like behavior. For this, male and female mice were treated with kombucha (at a dose of 2mg/kg for 10 days) and subjected to a depressive-like behavior model by LPS (0.83mg/kg i.p). After 24 hours of LPS administration, the animals were submitted to behavioral tests: open field, light dark box, and tail suspension test. The results obtained demonstrate that KT has the potential to reverse depressive-like behavior and attenuate anxious-like behavior and hypolocomotion caused by LPS in females. However, in males, the effect of the consumption of this beverage on anxious behavior and the open field test was not observed, still, LPS did not cause an increase in immobility in the tail suspension test. Therefore, it is suggested that the consumption of KT has beneficial effects on the modulation of depressive/anxious behavior in females and they are more sensitive to LPS-induced behavioral changes.

Keywords: Major Depressive Disorder (MDD), kombucha, lipopolysaccharide; depressive-like behavior.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Regiões cerebrais acometidas pelo TDM.....	18
Figura 2: Citocinas pró-inflamatórias e impacto no sistema nervoso central (SNC).....	20
Figura 3: Hiperativação do eixo HPA no TDM.....	24
Figura 4: Ativação da via das quinureninas.....	27
Figura 5: Eixo MIC - vias de comunicação.....	31
Figura 6: Alvos para manutenção/tratamento da integridade do eixo MIC.....	33
Figura 7: Esquema da evolução do comportamento doente/depressivo em modelo animal com LPS.....	36
Figura 8: Estrutura do LPS.....	37
Figura 9: Ativação imunológica mediada por LPS.....	39
Figura 10 Preparo e metabólitos do processo fermentativo do KT.....	41
Figura 11 Delineamento experimental.....	47
Figura 12 - Cromatograma de íons totais de chá de <i>Camelia sinensis</i> e kombucha por análise LC-UV-MS/MS, em ionização de modo positivo.....	51
Figura 13: Efeito do tratamento com kombucha sobre a diminuição da atividade exploratória provocada pelo LPS no campo aberto.....	53
Figura 14 - Efeito do tratamento com kombucha sobre o comportamento ansioso induzido pelo LPS em fêmeas.....	54
Figura 15: Efeito do tratamento com kombucha sobre o comportamento ansioso induzido pelo LPS em machos.....	55
Figura 16: Efeito do tratamento com LPS e kombucha sobre tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise química qualitativa do chá <i>C. sinensis</i> e kombucha por análise LC-UV-MS/MS.....	51
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico

ADTs - antidepressivos tricíclicos

AGCC - ácido graxo de cadeia

AQ - ácido quinolínico

BH₄ – tetrahidrobiopterina

BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

CRH – Corticotropina

CA - campo aberto

CCE - caixa claro/escuro

DA - dopamina

DSM-5 - Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais

ERK - quinases reguladas por sinal extracelular

EROS - espécies reativas de oxigênio

FOS - frutooligossacarídeos

GOS – galactooligossacarídeo

HPA - Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

IDO - indoleamina 2,3 dioxigenase

IFN- α - interferon alfa

INF- γ - interferon gama

IL-1 β - interleucina 1 beta

IL-6 - Interleucina 6

IMAO - inibidor da monoamina oxidase

ISRS - inibidor seletivo da recaptação de serotonina

KT - kombucha

KYNA - ácido quinurênico

LCR - Líquido cefalorraquidiano

L-DOPA - L-3,4-dihidroxifenilalanina

LPS - lipopolissacarídeo

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno

MIC - microbiota-cérebro-intestino

NF- κ B - Fator nuclear kappa

NMDA - receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato

OMS - Organização Mundial de Saúde

ON - óxido nítrico

PCR - Proteína C Reativa

PNS - Pesquisa Nacional de Saúde

QUI - quinurenina

QMO - quinurenina monooxigenase

RNS - espécies reativas de nitrogênio

RG - receptor de glicocorticóide

SNC - Sistema Nervoso Central

SCOBY - Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (Cultura simbiótica de bactérias e leveduras)

TSC - teste de suspensão da cauda

TDM - Transtorno Depressivo Maior

TFM - transplante fecal de microbiota

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

VO - via oral

5-HIAA - 5-hidroxiindolacético

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR: ASPECTOS GERAIS.....	16
1.2 DISFUNÇÕES IMUNOLÓGICAS E PRINCIPAIS MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS DO TDM	19
1.3 CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO TDM.....	19
1.4 “COMPORTAMENTO DOENTE” E CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS.....	22
1.5 EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL (HPA).....	24
1.6 MECANISMOS INFLAMATÓRIOS E METABOLISMO DE NEUROTRANSMISSORES	25
1.7 MECANISMOS IMUNOLÓGICOS DO EIXO MICROBIOTA-INTESTINO- CÉREBRO (MIC) NA ETIOLOGIA DO TDM	29
1.8 MODELO DE COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)	34
1.9 LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS).....	37
1.10 ALIMENTOS FERMENTADOS.....	39
1.10.1 Kombucha	40
1.11 JUSTIFICATIVA	43
2 OBJETIVOS.....	43
2.1 OBJETIVO GERAL	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1 ANIMAIS.....	44
3.2 KOMBUCHA.....	44

3.2.1 Caracterização do perfil metabólico do chá de <i>Camélia sinensis</i> e kombucha	45
3.2.1.1 Preparação da solução de amostra.....	45
3.2.1.2 Caracterização de metabólitos por LC-UV-MS/MS.....	45
3.3 LIPOPOLISSACARÍDEO.....	46
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	46
3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	47
3.5.1 Avaliação da atividade locomotora.....	48
3.5.2 Avaliação do comportamento tipo depressivo/ansioso.....	48
3.6 EUTANÁSIA.....	49
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
4 RESULTADOS.....	50
4.1 PERFIL METABÓLICO DO CHÁ VERDE (<i>CAMELIA SINENSIS</i>) E KOMBUCHA	50
4.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO LPS E KOMBUCHA SOBRE A DISTÂNCIA PERCORRIDA NO CAMPO ABERTO	52
4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO LPS E KOMBUCHA SOBRE O EFEITO TIPO ANSIOSO NA CAIXA CLARO ESCURO	53
4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO LPS E KOMBUCHA SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO NO TESTE DE SUSPENSÃO DA CAUDA	56
5 DISCUSSÃO.....	57
6 CONCLUSÕES.....	63
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
8 APÊNDICES	76
8.1 APÊNDICE A - EXPERIMENTOS PRÉVIOS REALIZADOS.....	76

1. INTRODUÇÃO

1.1. TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR: ASPECTOS GERAIS

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é um distúrbio psiquiátrico com grande prevalência, o qual pode evoluir para um estado crônico e incapacitante, afetando assim a qualidade de vida do indivíduo, já que possui alta morbidade e mortalidade, sendo considerado, portanto, um problema de saúde pública (CASSANO; FAVA, 2002; LIM et al., 2018).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) esse transtorno afeta 3,8% da população, incluindo 5,0% entre adultos e 5,7% entre adultos com mais de 60 anos. Acometendo atualmente aproximadamente 280 milhões de pessoas no mundo (WHO 2021). A prevalência global de TDM nos últimos 12 meses foi de aproximadamente 6% (KESSLER; BROMET, 2013), e ao longo da vida, a prevalência varia de 15 a 18%(BROMET et al., 2011), sendo que sua ocorrência em mulheres é o dobro em comparação com os homens (HIRSCHFELD, 2012; KESSLER; BROMET, 2013, WHO 2017). A diferença nessa prevalência é atribuída às diferenças sexuais na suscetibilidade e fatores ambientais (FAKHOURY, 2015; KUEHNER, 2017).

Ainda, uma revisão sistemática e meta-análise que avaliou a prevalência de TDM na população brasileira encontrou uma prevalência de 14% de sintomas depressivos, 8% desses sintomas nos últimos 12 meses, e ao longo da vida a mesma foi de 17% (SILVA et al., 2014). Dados de 2017, do estudo da carga global de morbidade, demonstram que o TDM é altamente incapacitante, ocupando a quarta posição como causa de anos vividos com incapacidade no Brasil e demais países (BONADIMAN et al., 2020) e segundo a OMS até 2030 o TDM irá liderar essa classificação (WHO 2008).

Referente à prevalência dessa desordem na população brasileira dados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) de 2019 estimam que 10,2% da população acima de 18 anos recebeu diagnóstico de depressão por profissional de saúde mental, esse percentual representa 16,3 milhões de pessoas e foi maior do que o encontrado em 2013 de 7,6%. As Regiões Sul e Sudeste apresentaram os valores percentuais de pessoas diagnosticadas com depressão maiores que o nacional, 15,2% e 11,5%,

respectivamente; e quando comparado por sexo a prevalência entre sexo feminino foi de 14,7 e masculino 5,1% (STOPA et al., 2020, IBGE 2019).

Além disso, esse transtorno também é uma comorbidade comumente associada a outros distúrbios psiquiátricos, abuso de substâncias/medicamentos (KESSLER; BROMET, 2013; RUSH et al., 2005), doenças crônicas inflamatórias, acidente vascular encefálico, doenças autoimunes e doenças neurodegenerativas (KHAIROVA et al., 2009; LOTFALIANY et al., 2018).

De acordo com os critérios atuais de diagnóstico do manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais (DSM-5), o TDM é caracterizado por nove sintomas: 1) Humor deprimido; 2) Perda de interesse ou prazer (Anedonia); 3) Perda ou aumento do apetite ou peso; 4) Insônia ou hipersonia; 5) Agitação ou retardo psicomotor; 6) Perda de energia ou fadiga; 7) Sentimentos de inutilidade ou culpa; 8) Concentração prejudicada ou indecisão; 9) Ideação suicida (pensamentos e comportamentos suicidas). É importante frisar que para o correto diagnóstico de depressão, os sintomas acima devem ser presentes por no mínimo 2 semanas consecutivas e obrigatoriamente um dos sintomas apresentados deve ser humor deprimido ou anedonia (AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION, 2013).

A fisiopatologia do TDM permanece obscura por sua complexidade e envolvimento de diferentes mecanismos biológicos que podem ter um papel importante tanto na etiologia quanto na progressão da doença (VERDUIJN et al., 2015). Com isso, algumas hipóteses foram aventadas no intuito de elucidar os mecanismos envolvidos: entre elas a teoria monoaminérgica, a deficiência de neurotrofinas, a hiperfunção do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA) e disfunções do sistema imune (ROT; MATHEW; CHARNEY, 2009; VERDUIJN et al., 2015).

A hipótese clássica é a monoaminérgica, que conduz a base do tratamento do TDM atual. Assim, os fármacos de primeira linha são os inibidores seletivos de recaptção da serotonina (ISRS). Apesar de amplamente utilizados, apresentam eficácia limitada e efeito retardado uma vez que apenas um terço dos pacientes responde ao tratamento 2 a 4 semanas após seu início com relatos de diversos efeitos colaterais (MALHI; MANN, 2018). Ademais, devido à natureza multicausal e sintomas heterogêneos do TDM existe um elevado número de pacientes que não respondem

ao tratamento com ISRS (MALHI; MANN, 2018). Deste modo, outros mecanismos patológicos devem ser observados para o entendimento e tratamento deste distúrbio.

Dentre as regiões mais afetadas pelo TDM, podemos citar as corticais como o córtex pré-frontal, órbito-frontal, cingulado anterior e hipocampo, amígdala e estriado ventral (figura 1) (FAKHOURY, 2015; ROT; MATHEW; CHARNEY, 2009). Pacientes com TDM apresentam perda neuronal e redução significativa de volume de regiões como hipocampo e amígdala que regulam humor e processos de aprendizagem e memória, as quais têm conexões com áreas corticais, que desempenham um papel importante na tomada de decisão e na inibição da resposta emocional. Uma falha na conectividade destas regiões compromete a atividade límbica levando à desregulação neuroendócrina e hiperatividade simpática (FAKHOURY, 2015; ROT; MATHEW; CHARNEY, 2009).

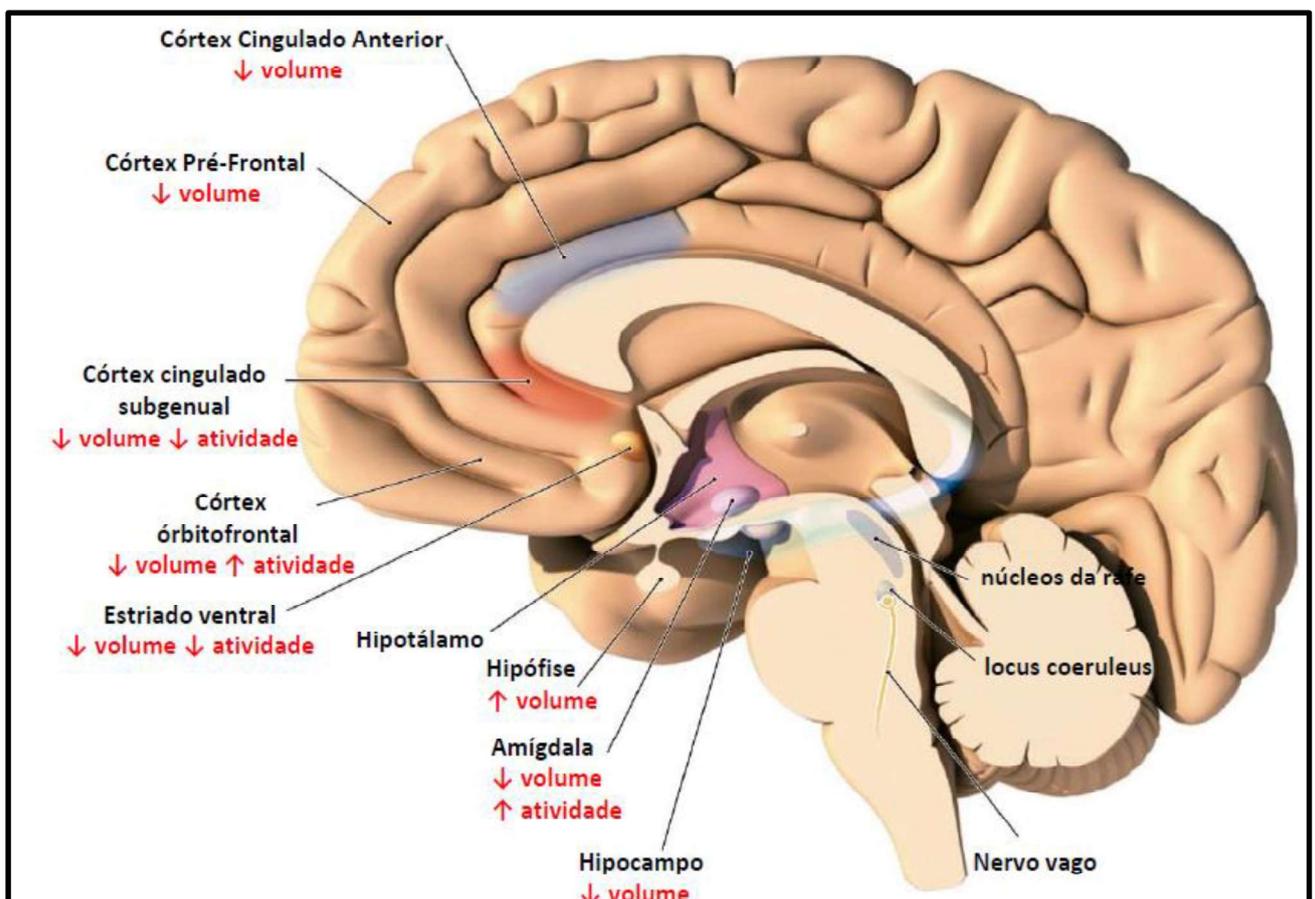


Figura 1: Adaptado de (ROT; MATHEW; CHARNEY, 2009) - Regiões cerebrais acometidas pelo TDM.

Recentemente, a associação entre TDM e respostas imunes inatas e/ou adaptativas desreguladas tem sido investigada com crescente interesse, tendo em vista a frequência aumentada dessa desordem em pacientes que sofrem de doenças inflamatórias crônicas (JACOB; ROCKEL; KOSTEV, 2017). Portanto, o foco deste trabalho será no envolvimento das disfunções imunológicas no TDM.

1.2. DISFUNÇÕES IMUNOLÓGICAS E PRINCIPAIS MECANISMOS NEUROBIOLÓGICOS DO TDM

Diversas evidências científicas apontam o envolvimento de mecanismos inflamatórios na etiologia do TDM: o aumento de marcadores e citocinas pró-inflamatórias, através de estudos *post-mortem*, além de medicamentos com ação no sistema imunológico que podem afetar o humor. Essas alterações compartilham semelhanças com o chamado “comportamento doente”, uma resposta normal ao aumento de citocinas pró-inflamatórias associadas à infecção ou inflamação que é frequentemente associada a uma variedade de fatores distintos (estresse psicossocial, obesidade, dieta pobre, sono diminuído, isolamento social) que são conhecidos por resultar em um aumento nos marcadores inflamatórios (DOWLATI et al., 2010; KHAIROVA et al., 2009; MILLER; MALETIC; RAISON, 2009b).

Os principais mecanismos envolvidos serão detalhados a seguir:

1.3. CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO TDM

As citocinas são um grupo de glicoproteínas previamente descobertas no contexto da ativação celular e comunicação entre as células no sistema imunológico que exercem papel fundamental na manutenção da homeostase da imunidade inata e adquirida e podem ser “pró-inflamatórias” ou “anti-inflamatórias”, dependendo de seus efeitos nas células-alvo (KHAIROVA et al., 2009; PETRALIA et al., 2020).

A presença e a atividade de citocinas no cérebro não têm seu papel nas funções fisiológicas e patológicas totalmente elucidado, mas sua expressão e atividade são induzidas em resposta a infecção, traumatismo craniano, isquemia, acidente vascular cerebral ou várias doenças neurodegenerativas (JEON; KIM, 2018; KHAIROVA et al., 2009). No entanto, as citocinas pró-inflamatórias também são expressas no cérebro saudável e desempenham um papel ativo em eventos celulares que induzem mudanças estruturais no nível sináptico (KHAIROVA et al., 2009).

Indivíduos com TDM têm níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo uma ligação potencial dessa desordem e ativação da resposta inflamatória (PETRALIA et al., 2020; YOUNG; BRUNO; POMARA, 2014) (KHAIROVA et al., 2009; MILLER; MALETIC; RAISON, 2009). Assim, as citocinas podem contribuir na etiologia da depressão, atuando diretamente nos neurônios, astrócitos e micróglia, através da sua passagem pela barreira hematoencefálica, ou por meio de sinais mediados por vias aferentes, como as do nervo vago (MALHI; MANN, 2018) e interagir com praticamente todos os componentes fisiopatológicos relevantes para a depressão, incluindo metabolismo de neurotransmissores, função neuroendócrina e plasticidade neural (figura 2) (BAUER; TEIXEIRA, 2021; RUIZ et al., 2022).

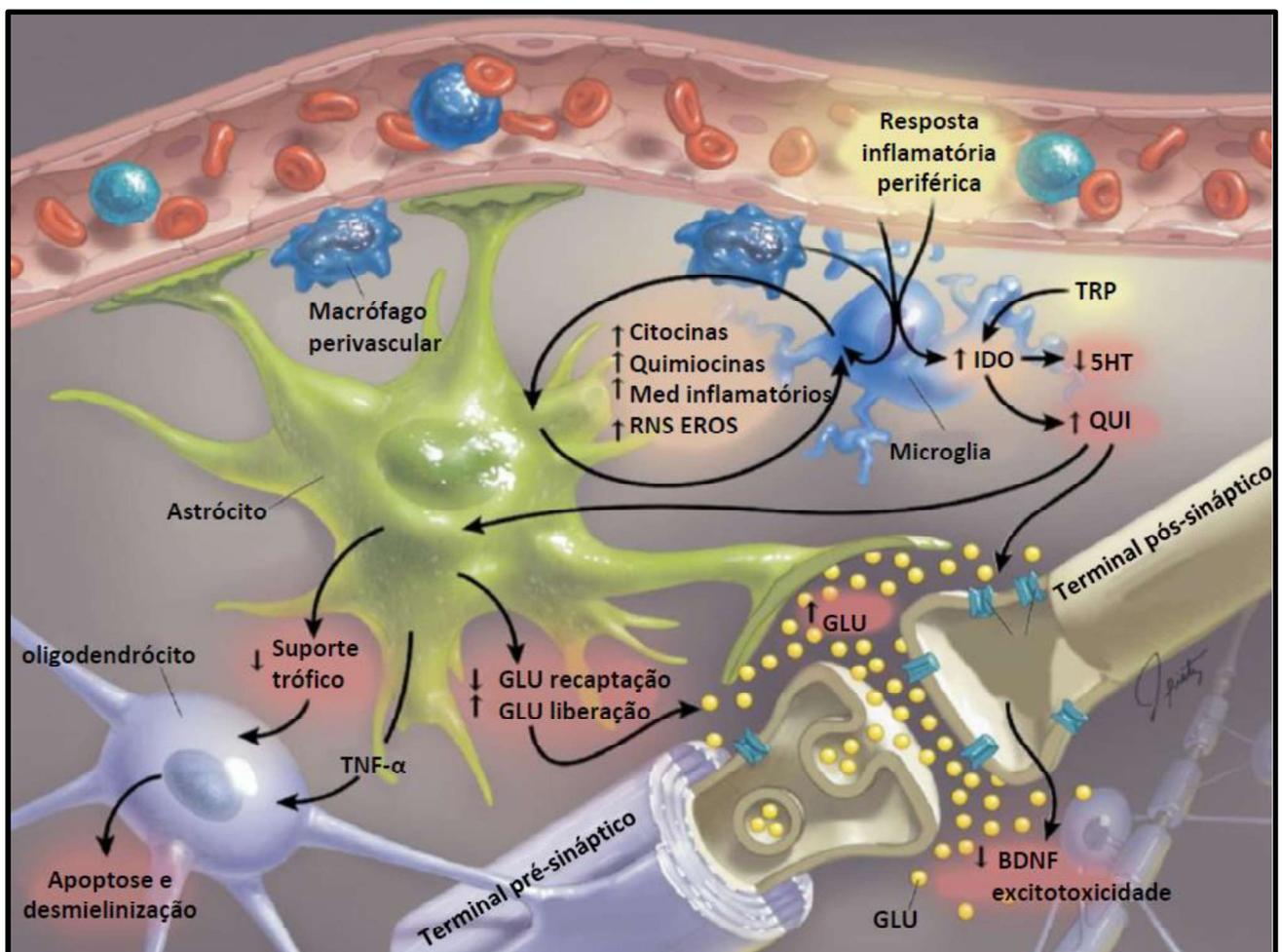


Figura 2: Adaptado de MILLER; MALETIC; RAISON, 2009 citocinas pró-inflamatórias e impacto no sistema nervoso central (SNC). As citocinas periféricas ativam a micróglia que inicia a cascata inflamatória no SNC através da liberação de citocinas pró inflamatórias, quimiocinas, mediadores inflamatórios e espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (RNS e EROS, respectivamente) que irão induzir a ativação mútua de astrócitos, potencializando os

sinais inflamatórios dentro do SNC. Com essa potencialização ocorre uma redução do suporte trófico com apoptose de células de suporte como oligodendrócitos, o triptofano (TRP) é catabolizado em metabólitos potencialmente neurotóxicos (QUI), ocorre um aumento da liberação de glutamato (GLU) e todas essas alterações culminam em redução de fatores neurotróficos como o BDNF, prejudicando a plasticidade do SNC.

Estudos descrevem que tanto pacientes fisicamente doentes quanto saudáveis diagnosticados com TDM exibem todas as características da inflamação, incluindo elevações nas citocinas inflamatórias no sangue e no líquido cefalorraquidiano (LCR), bem como, elevações nas concentrações sanguíneas periféricas de proteínas de fase aguda, quimiocinas, moléculas de adesão e mediadores inflamatórios como as prostaglandinas (PETRALIA et al., 2020; RAISON; CAPURON; MILLER, 2006; YOUNG; BRUNO; POMARA, 2014). Essa elevação dos marcadores inflamatórios é associada a alguns dos sintomas depressivos como fadiga, disfunção cognitiva e sono prejudicado (BAUER; TEIXEIRA, 2021; PETRALIA et al., 2020; YOUNG; BRUNO; POMARA, 2014).

Além disso, está comprovado que administração aguda e crônica de citocinas ou indutores de sua liberação, como LPS podem causar sintomas comportamentais que se sobrepõem aos encontrados no TDM. Por exemplo, voluntários normais injetados com LPS exibiram aumentos agudos nos sintomas de depressão e ansiedade, ainda, a gravidade dos sintomas foi correlacionada com o aumento das concentrações de citocinas periféricas (JEON; KIM, 2018; REICHENBERG et al., 2002). Estes achados corroboram com diversos estudos em animais, demonstrando que citocinas e indutores de sua liberação levam a alterações comportamentais encontradas na depressão, incluindo anedonia, diminuição da atividade, disfunção cognitiva e sono alterado (DANTZER, 2006; LASSELIN et al., 2020; LI; LUO; WAN, 2020).

Além do mais, a exposição de longo prazo a citocinas pró-inflamatórias também mostrou levar a alterações comportamentais marcantes em humanos. Cerca de 20 a 50% dos pacientes em terapia crônica com interferon alfa (IFN- α) para o tratamento de doenças infecciosas ou câncer desenvolveram sintomas depressivos revertidos pela inclusão de medicamentos antidepressivos (CAPURON et al., 2002; JEON; KIM, 2018; OMINIQUE et al., 2001; YOUNG; BRUNO; POMARA, 2014).

Por outro lado, a terapia anti-inflamatória também mostrou efeito antidepressivo em pacientes com doenças autoimunes e inflamatórias. O uso do etanercepte, um inibidor de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), para o tratamento da psoríase demonstrou que os participantes tratados com o fármaco apresentaram melhora significativa nos sintomas depressivos em comparação aos participantes tratados com placebo, sendo esse efeito independente da melhora da doença (STEPHEN TYRING, 2006), o que é consistente com achados da literatura os quais descrevem que antagonistas de citocinas ou agentes anti-inflamatórios podem bloquear o desenvolvimento de alterações comportamentais após a ativação imune em modelos pré-clínicos (DANTZER et al., 2008).

A relação do sistema imune e TDM mencionada acima ficou bem estabelecida nos resultados de duas meta-análises que confirmaram que os níveis plasmáticos de proteínas relacionadas à inflamação, incluindo TNF- α , IL-1 β , IL-6, PCR e IFN estavam aumentados em pacientes com TDM (DOWLATI et al., 2010; HOWREN; LAMKIN; SULS, 2009), e os níveis de IL-6 e TNF- α eram mais aumentados em pacientes com essa desordem que tentaram suicídio do que pacientes não suicidas com TDM e controles saudáveis (JANELIDZE et al., 2011).

Ainda, outra correlação entre o TDM e resposta imune é a normalização dos níveis séricos dessas citocinas pró-inflamatórias ocasionada pelo tratamento desses pacientes com antidepressivos (DE BERARDIS D et al., 2010; JANSSEN et al., 2010; JEON; KIM, 2018; PETRALIA et al., 2020).

1.4. “COMPORTAMENTO DOENTE” E CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

O “comportamento doente” é classificado como um conjunto coordenado de mudanças comportamentais que se desenvolvem em indivíduos doentes durante o curso de processos inflamatórios ou infecciosos, sendo caracterizado por sintomas como fraqueza, mal-estar, redução da ingestão de alimentos e líquidos, diminuição do interesse pelo ambiente e letargia, que são sintomas que também podem ser encontrados em episódios depressivos (DANTZER, 2006; LI; LUO; WAN, 2020).

Esses sintomas são induzidos por citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-6, TNF- α e INF- γ , produzidas de forma periférica ou no SNC pelas células da glia, em destaque a micróglia (DANTZER, 2006; DANTZER et al., 2008; KHAIROVA et al.,

2009; LI; LUO; WAN, 2020). Sendo assim, o comportamento doente é uma resposta adaptativa a infecções e inflamações com o objetivo de manter a homeostase. No entanto, uma produção excessiva e prolongada de citocinas pró-inflamatórias no corpo pode danificar os tecidos, incluindo o cérebro e pode gerar sintomas depressivos e favorecer o desenvolvimento do TDM (BASSI et al., 2012; DANTZER, 2006; REICHENBERG et al., 2002).

Isto posto, alterações semelhantes podem ser encontradas em controles saudáveis que são expostos a ativadores de citocinas pró-inflamatórias (REICHENBERG et al., 2001, 2002). A administração de endotoxina leva a um aumento nos níveis de IL-1 β , IL-6, TNF- α , bem como, do cortisol (REICHENBERG et al., 2001). Assim, como, a indução experimental da liberação de citocinas em controles saudáveis leva a um aumento transitório nos níveis de ansiedade e humor deprimido, bem como uma diminuição na função de memória verbal e não verbal (REICHENBERG et al., 2001).

Em pacientes saudáveis, a administração de endotoxinas também resulta em alterações significativas na ingestão de alimentos, corroborando com o observado em animais (JEON; KIM, 2018; REICHENBERG et al., 2002). Diferenças relacionadas ao sexo na resposta a estímulos inflamatórios podem predispor as mulheres a desenvolver sintomas de depressão (DALLA et al., 2010; JEON; KIM, 2018; KUEHNER, 2017; LIMA et al., 2022; PITYCHOUTIS et al., 2009).

Em um estudo de mecanismos neurais subjacentes das alterações de humor associadas à inflamação por ressonância magnética funcional, no grupo controle saudável houve um aumento da atividade no córtex cingulado anterior, além de, uma diminuição da conectividade dessa região com a amígdala, córtex pré-frontal, núcleo accumbens e sulco temporal superior (HARRISON et al., 2009).

Portanto, pode-se concluir que um estímulo crônico inflamatório irá exacerbar uma resposta imune primariamente adaptativa culminando no desenvolvimento de sintomas depressivos.

1.5. EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL (HPA)

A hiperfunção do eixo HPA é um dos achados mais consistentes na neurobiologia do TDM (BAUER; TEIXEIRA, 2021; KNORR et al., 2010). Esse eixo atua como mediador da resposta ao estresse, sendo o hormônio liberador de corticotropina (CRH) liberado pelo hipotálamo, e a estimulação dos receptores de CRH na adenohipófise estimula a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da hipófise para o plasma. O ACTH então estimula a liberação de cortisol do córtex adrenal (figura 3) (PLOTSKY; OWENS; NEMEROFF, 1998; RUIZ et al., 2022).

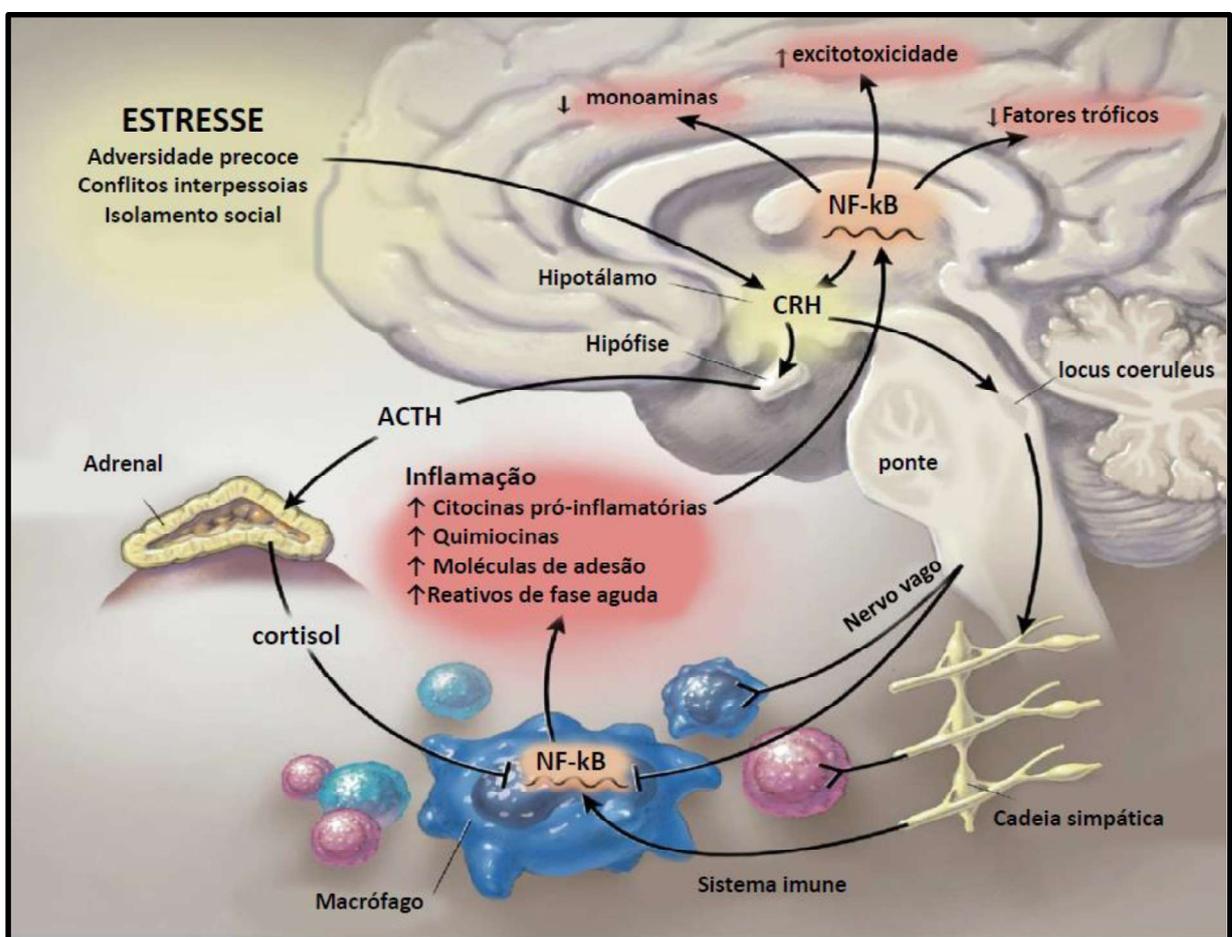


Figura 3: Adaptado de MILLER; MALETIC; RAISON, 2009, Hiperativação do eixo HPA no TDM. Estímulos estressores ativam a liberação de hormônio liberador de corticotropina (CRH) pelo hipotálamo, essa liberação induz a adenohipófise a liberar hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) para o plasma, esse hormônio estimula a produção de cortisol pelo córtex da adrenal que atua inibindo a via de sinalização inflamatória do NF-kB. Esse eixo é hiperativado na presença de fatores como a redução de monoaminas, a redução de fatores tróficos e a excitotoxicidade, que irão ativar a via de sinalização do NF-kB que gera uma resistência na

atividade de bloqueio do cortisol dessa via, prejudicando assim o feedback negativo para o hipotálamo e adenohipófise para cessar a ativação do eixo, culminando em sua hiperativação.

Embora uma ativação aguda do eixo HPA possa ser uma resposta apropriada a um estressor agudo, a hiperatividade crônica do eixo HPA pode resultar em problemas duradouros (PLOTSKY; OWENS; NEMEROFF, 1998; RUIZ et al., 2022). Pacientes com TDM apresentam níveis elevados de cortisol, bem como sensibilidade diminuída ao CRH (KELLER et al., 2017; PETRALIA et al., 2020; RUIZ et al., 2022; STETLER; MILLER, 2011).

Ainda, o estresse crônico leva a um aumento robusto dos níveis de IL-1 β e IL-6 que vão estimular a liberação de CRH e ACTH e diminuir a expressão de receptores de glicocorticóides (RG) (BEISHUIZEN; THIJIS, 2003; DANTZER et al., 2008). Além disso, as citocinas pró-inflamatórias exercem uma importante influência na atividade do eixo HPA e podem mediar o hipercortisolismo e a diminuição da sensibilidade do eixo HPA frequentemente observados no TDM (figura 3) (PETRALIA et al., 2020; RIVEST, 2010; RUIZ et al., 2022).

Sendo assim, uma via pela qual as citocinas podem influenciar a função do eixo HPA é através dos efeitos na regulação do feedback negativo. A regulação do feedback negativo prejudicada nesse eixo é uma marca registrada do TDM, e é refletida pela diminuição da capacidade de resposta aos glicocorticóides (ou resistência aos glicocorticóides), acredita-se que a diminuição da regulação por feedback da função do eixo HPA pelos glicocorticóides seja mediada, em parte, por alterações no RG (PARIANTE; MILLER, 2001; RUIZ et al., 2022).

1.6. MECANISMOS INFLAMATÓRIOS E METABOLISMO DE NEUROTRANSMISSORES

Ao atingir o cérebro as citocinas inflamatórias influenciam na síntese, liberação e recaptação de neurotransmissores relevantes para o humor, incluindo as monoaminas (MILLER, 2009). Na literatura existem evidências de estudos em animais nos quais a administração de citocinas ou seus indutores podem afetar o metabolismo da serotonina, norepinefrina e dopamina (DA) (ANISMAN; MERALI; HAYLEY, 2008; FELGER; TREADWAY, 2017). Em relação aos mecanismos envolvidos nessas

alterações, a enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) exerce um papel fundamental e é ativada através da estimulação de múltiplas vias de sinalização inflamatórias por citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-2, INF- γ e TNF- α (DOBOS et al., 2012; TROUBAT et al., 2021).

A (IDO) cataboliza o triptofano em quinurenina (QUI), sendo assim, níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias podem diminuir a quantidade de triptofano disponível para a síntese de serotonina e tornar os pacientes mais vulneráveis ao desenvolvimento do TDM (DANTZER et al., 2008, 2011; MILLER, 2009; RUIZ et al., 2022). A quinurenina (QUI) é metabolizada pela enzima quinurenina monooxigenase (QMO) em ácido quinolínico (AQ) e ácido quinurênico (KYNA), dois metabólitos potencialmente neurotóxicos. A QUI é preferencialmente convertida em AQ na micróglia e KYNA em astrócitos (TROUBAT et al., 2021). O AQ é agonista do receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA) e por meio desse mecanismo, as citocinas pró-inflamatórias também podem contribuir para um desequilíbrio na neurotransmissão glutamatérgica no TDM (figura 4) (DANTZER et al., 2011; TROUBAT et al., 2021).

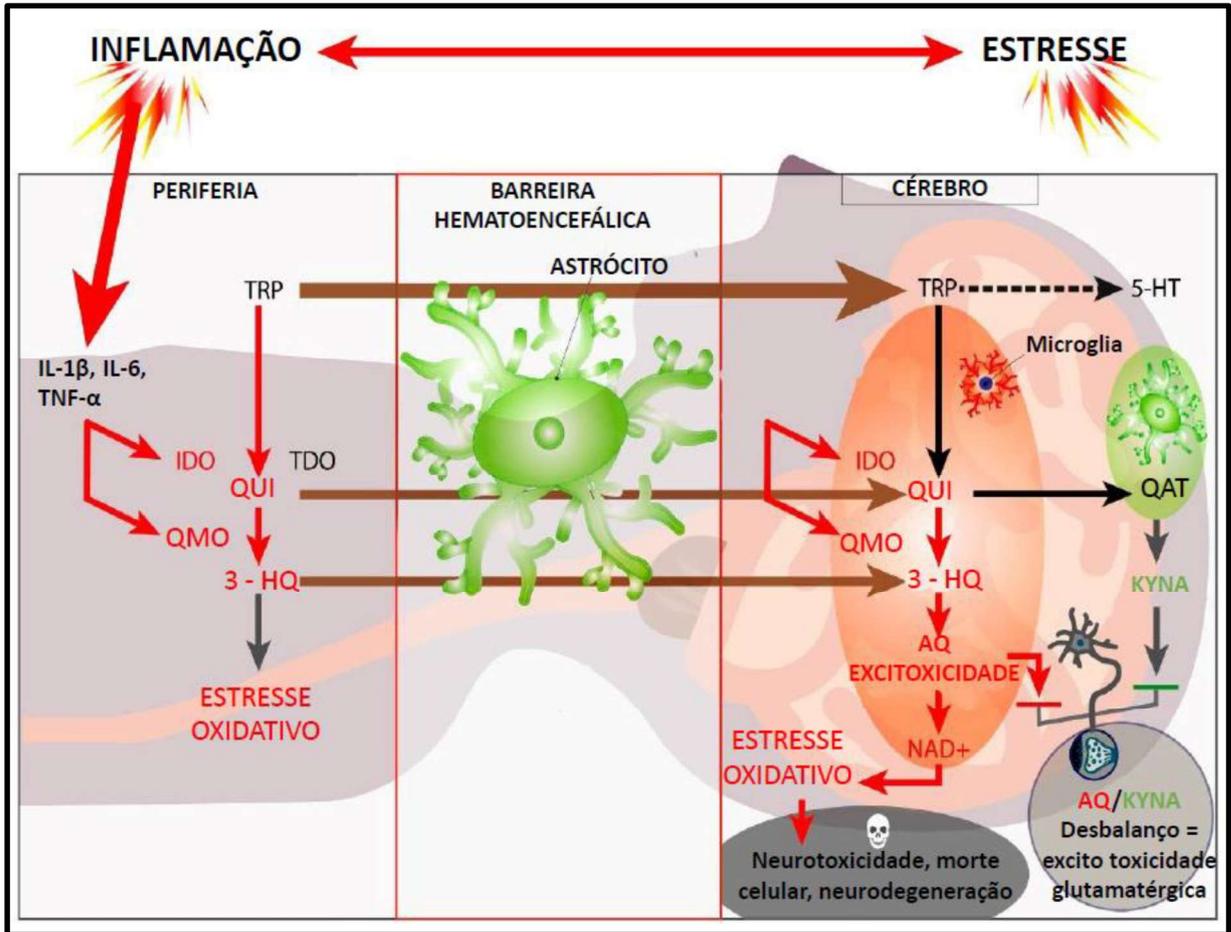


Figura 4: Adaptada de TROUBAT et al., 2021 - Ativação da via das quinureninas. Na presença de citocinas pró-inflamatórias o triptofano (TRP) é catabolizado pela enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) em quinurenina (QUI), que através da enzima quinurenina monooxigenase (QMO) a metaboliza em ácido quinolínico (AQ) e ácido quinurênico (KYNA), quando ocorre um desbalanço na relação AQ/KYNA a neurotransmissão glutamatérgica é ativada o que causa excitotoxicidade culminando em morte celular e neurodegeneração.

Pacientes tratados com IFN- α tem atividade da IDO aumentada, o que resulta em níveis mais elevados do KYNA e AQ no plasma (WICHERS et al., 2005), o tratamento com IFN- α também resulta em níveis aumentados de QUI e AQ no líquido cefalorraquidiano (LCR), a presença desses metabólitos está correlacionada com sintomas clínicos do TDM (CAPURON et al., 2002; RAISON et al., 2010). Essa produção aumentada dos níveis de AQ estimulada pela resposta inflamatória gera prejuízo na plasticidade sináptica e, com isso, contribui para os distúrbios cognitivos e comprometimento da memória que são frequentemente observados no TDM (KHAIROVA et al., 2009). Além disso, o bloqueio da IDO inibiu o desenvolvimento de

comportamento tipo depressivo induzido por LPS em camundongos (O'CONNOR et al., 2009). É importante ressaltar que a ativação de IDO induzida por citocinas e a produção de QUI parecem ter efeitos importantes nos neurotransmissores e no humor independentes dos efeitos da serotonina, pois, a administração de QUI por si só, mostrou induzir comportamento do tipo depressivo em camundongos (O'CONNOR et al., 2009).

Conforme mencionado anteriormente, a ativação da IDO também impacta no metabolismo de outras monoaminas, o KYNA demonstrou inibir a liberação de glutamato, que, por extensão, pode inibir a liberação de dopamina (DA), cuja liberação é regulada em parte pela atividade glutamatérgica (BORLAND; MICHAEL, 2004; FELGER; TREADWAY, 2017).

De fato, a administração intraestriatal de KYNA demonstrou reduzir significativamente a DA extracelular no estriado de ratos (WU; RASSOULPOUR; SCHWARCZ, 2007). Em contraste, o AQ promove a liberação de glutamato através da ativação de receptores NMDA (TROUBAT et al., 2021). Também, as citocinas demonstraram influenciar a síntese de DA. Neste contexto, a injeção intramuscular de IFN- α em ratos demonstrou diminuir as concentrações de tetrahydrobiopterina (BH₄) e DA no SNC em associação com a estimulação de óxido nítrico (ON) (KITAGAMI et al., 2003), essa redução de DA foi atribuída a atenuação do BH₄, que é um importante cofator enzimático para a tirosina hidroxilase converter a tirosina em L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), o qual é um fator limitante da síntese de DA, além disso, esse cofator também é necessário para a síntese de ON e, portanto, o aumento de ON está associado ao aumento da utilização de BH₄, diminuindo sua disponibilidade para a síntese de DA (FELGER; TREADWAY, 2017; KITAGAMI et al., 2003).

Considerando que a ativação da microglia está associada ao aumento da produção de ON (TROUBAT et al., 2021), sugerindo que as influências das citocinas na BH₄ via ON podem ser um mecanismo comum pelo qual a inflamação reduz a disponibilidade de DA em regiões cerebrais relevantes. Corroborando isso, foi verificado que o tratamento com um inibidor da ON sintase reverteu os efeitos inibitórios do IFN- α nas concentrações cerebrais de BH₄ e DA (KITAGAMI et al., 2003).

Além disso, as citocinas e suas vias de sinalização podem influenciar a recaptação de monoaminas (MILLER, 2009). As vias de MAPK, incluindo p38 e quinases reguladas por sinal extracelular (ERK) 1/2, que medeiam os efeitos de citocinas na proliferação/diferenciação celular, a apoptose, e a expressão gênica de mediadores inflamatórios, aumentam a atividade de transportadores de membrana para serotonina, DA e norepinefrina (CHANG; KARIN, 2001; ZHU; BLAKELY; HEWLETT, 2006). Por exemplo, IL-1 β e TNF- α demonstraram aumentar significativamente a recaptação de serotonina em sinaptossomas cerebrais de ratos através da ativação de p38 MAPK (ZHU; BLAKELY; HEWLETT, 2006). A ativação de p38 MAPK em células mononucleares do sangue periférico foi associada à diminuição das concentrações no LCR do metabólito da serotonina, ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), em macacos rhesus juvenis que sofreram abuso materno quando bebês (SANCHEZ et al., 2007). Em concordância com esses achados, em humanos tratados com IFN- α foi verificado que a redução de 5-HIAA no LCR estava correlacionada não apenas com o humor deprimido, mas também com o aumento de IL-6 no LCR, que é capaz de ativar as vias MAPK e IDO (RAISON et al., 2009).

Com base nesses achados, podemos perceber que as citocinas pró inflamatórias exercem influência no metabolismo de neurotransmissores tanto na diminuição de sua síntese, quanto em sua recaptação reduzindo assim a sua disponibilidade, o que pode contribuir com a apresentação de sintomas do TDM. Assim, a indução relativa de KYNA x AQ pode determinar os efeitos das citocinas no SNC e continua sendo uma área importante para investigação.

1.7. MECANISMOS IMUNOLÓGICOS DO EIXO MICROBIOTA-INTESTINO-CÉREBRO (MIC) NA ETIOLOGIA DO TDM

Nas últimas duas décadas a microbiota intestinal (MI) e sua influência na saúde tem despertado interesse de diversas áreas de pesquisa, entre elas a neurociência (BUTLER; CRYAN; DINAN, 2019).

O intestino humano é habitado por cerca de 10^{13} a 10^{14} microorganismos, esse número de microorganismos supera em 10 vezes o número de células humanas e possuem 100 vezes mais genes do que o genoma humano. Sendo assim, a

complexidade bioquímica da MI excede a do cérebro (BUTLER; CRYAN; DINAN, 2019; DINAN; CRYAN, 2017).

A MI começa a se formar desde a vida intrauterina e desempenha papel essencial em funções como maturação do sistema imunológico, funcionamento saudável do eixo HPA e sistema endócrino, formação e manutenção da barreira hematoencefálica, neurogênese e mielinização (CRYAN et al., 2019).

Portanto, a microbiota intestinal exerce importante efeito no sistema imunológico, no desenvolvimento cerebral e comportamento, os microrganismos que vivem no intestino estão em contato com as células epiteliais e do sistema imunológico do intestino, e através desse contato estão envolvidos no desenvolvimento de muitos distúrbios neuropsiquiátricos e metabólicos (CRYAN et al., 2019).

Alterações na diversidade dos componentes das comunidades comensais da MI em relação à comunidade encontrada em indivíduos saudáveis são denominadas disbiose, essas alterações podem ocorrer devido a fatores genéticos, tipo de parto, alimentação habitual, estresse e doenças (WALKER, 2017).

Ainda, a MI exerce comunicação com outros órgãos por vários eixos, um eixo de importância relevante e muito estudado é o eixo microbiota-intestino-cérebro (MIC) (EVRENSEL; CEYLAN, 2015; FENG; CHEN; WANG, 2018).

Esse eixo possui comunicação bidirecional com o SNC através do nervo vago e vias imunológica e endócrina, exercendo assim efeito no metabolismo de monoaminas, eixo HPA e atividade imunológica do SNC, portanto, um desbalanço nessa comunicação, que pode ser causado por disbiose ou permeabilidade da barreira intestinal, o que vai gerar contato do lúmen intestinal com endotoxinas como o LPS, e ativar uma resposta imunológica exacerbada, que irá acarretar em um desbalanço do eixo e estimular todas as alterações imunológicas envolvidas na fisiopatologia do TDM discutidas anteriormente neste trabalho (figura 5) (BUTLER; CRYAN; DINAN, 2019; DINAN; CRYAN, 2017).

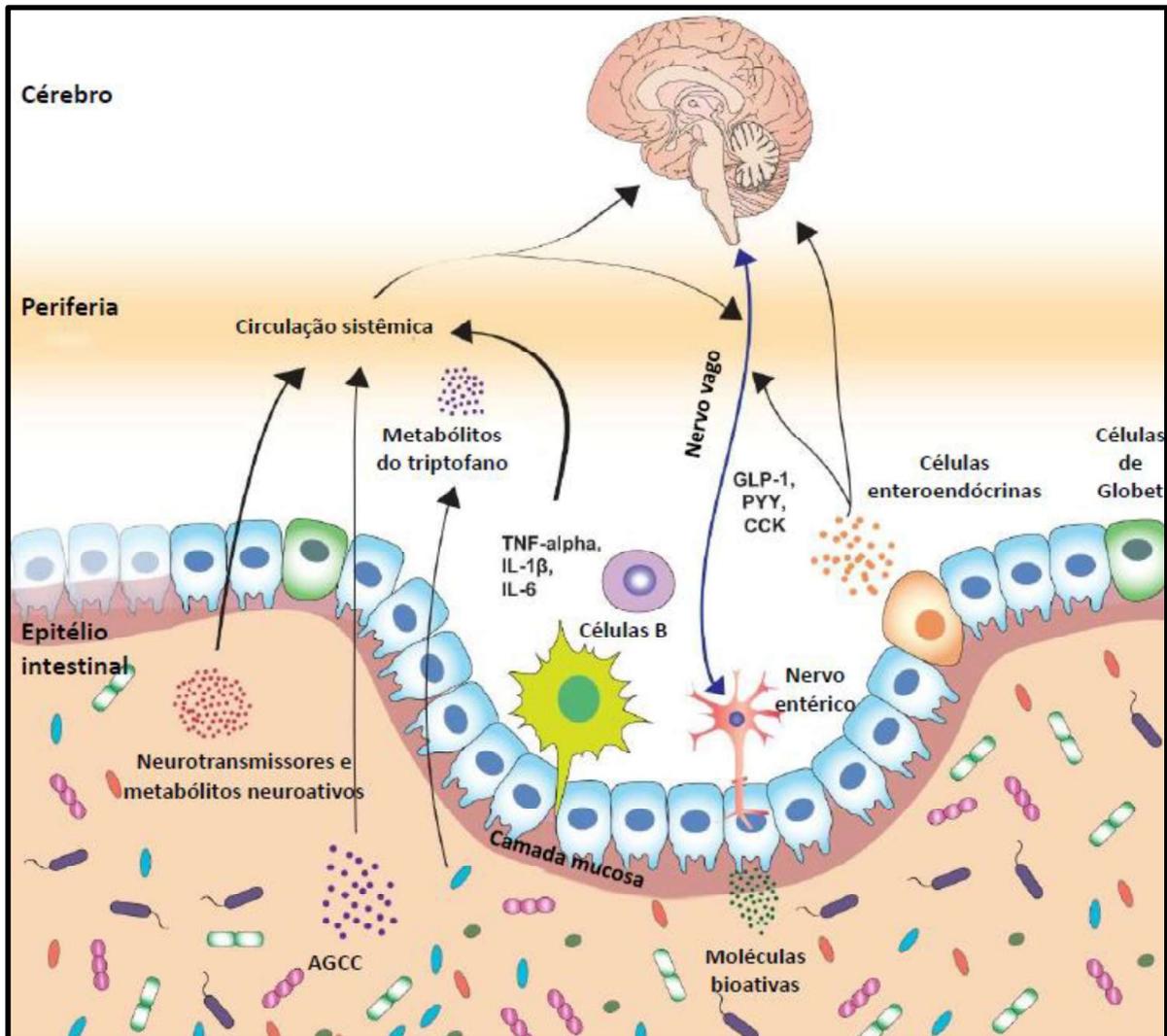


Figura 5: Adaptada de CRYAN et al., 2019 - Eixo MIC - vias de comunicação. Esquema ilustrando as vias bidirecionais conhecidas de comunicação entre o eixo MIC, em destaque a comunicação via nervo vago, respostas imunomoduladoras, sinalização enteroendócrina e de metabólitos microbianos.

Pacientes com TDM possuem alteração da composição da MI (disbiose) o que pode estar relacionada a vários fatores como: o uso de antibióticos, dieta pouco saudável, estresse, causas genéticas etc. (BUTLER; CRYAN; DINAN, 2019). Por exemplo, em estudos realizados em pacientes com TDM os níveis de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Firmicutes*, *Faecalibacterium* e *Ruminococcus* estavam diminuídos, enquanto os níveis de *Prevotella*, *Bacteroides* e *Proteobacteria* aumentados (AIZAWA et al., 2016; LIU et al., 2016b), em estudos com animais os resultados foram semelhantes (PARK et al., 2013; YU et al., 2017).

A disbiose causada pelo aumento do uso de antibióticos pode ser um fator associado a crescente prevalência de TDM na atualidade (BERCIK; COLLINS, 2014; FROLINGER et al., 2019). Em modelos pré-clínicos os antibióticos têm gerado comportamento tipo depressivo/ansioso e alteração da MI em animais (DEGROOTE et al., 2016; HOBAN et al., 2016; MINTER et al., 2016). Entretanto, existe uma correlação significativa entre a dose e a duração do uso de antibióticos e a probabilidade de transtorno neuropsiquiátrico (DELUNGAHAWATTA et al., 2017).

Da mesma forma, descobriu-se que crianças expostas a antibióticos no primeiro ano de vida apresentaram taxas mais altas de problemas comportamentais, sintomas de depressão e comprometimento cognitivo, que prevaleceu ao decorrer da infância até os 11 anos de idade após nova investigação (SLYKERMAN et al., 2017, 2019).

Considerando que pacientes com depressão possuem uma composição específica da MI, alguns estudos realizaram o transplante fecal de microbiota (TFM) de pacientes com depressão em ratos e observaram que esses animais desenvolveram sintomas depressivos e alterações metabólicas da doença (KELLY et al., 2016; ZHENG et al., 2016). De acordo com os resultados desses estudos, pode-se especular que a disbiose pode desempenhar um papel causal para comportamentos semelhantes à depressão.

Corroborando com a hipótese da correlação entre disbiose e sintomas depressivos, evidências sugerem que o tratamento com antidepressivos também possui ação na regulação do eixo MIC, por exercer ação antimicrobiana (MACEDO et al., 2017). Por exemplo, os antidepressivos inibidores da monoamina oxidase (IMAOs) inibem a síntese da parede celular bacteriana, já os ISRS inibem a bomba de efluxo dessas bactérias, enquanto os antidepressivos tricíclicos (ADTs) exibem um efeito antibiótico ao inibir o antiplasmídeo e a DNA girase (MACEDO et al., 2017). Portanto, a eficácia antidepressiva padrão provavelmente não se limita apenas às funções sinápticas, mas também é obtida pela regulação da MI (MACEDO et al., 2017).

Com essas descobertas do envolvimento da MI na etiologia dos sintomas depressivos, novas alternativas terapêuticas voltadas para a modulação e recuperação dessa MI com probióticos (referem-se a espécies de bactérias vivas que, quando ingeridas em quantidades adequadas, conferem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro), prébióticos (um substrato que é seletivamente utilizado por microorganismos

hospedeiros, conferindo um benefício à saúde), alimentos fermentados e transplante fecal de microbiota tem apresentado resultados promissores em manter o balanço da comunicação do eixo MIC (figura 6) (ADAN et al., 2019; BERDING; CRYAN, 2022; PEREIRA et al., 2019).

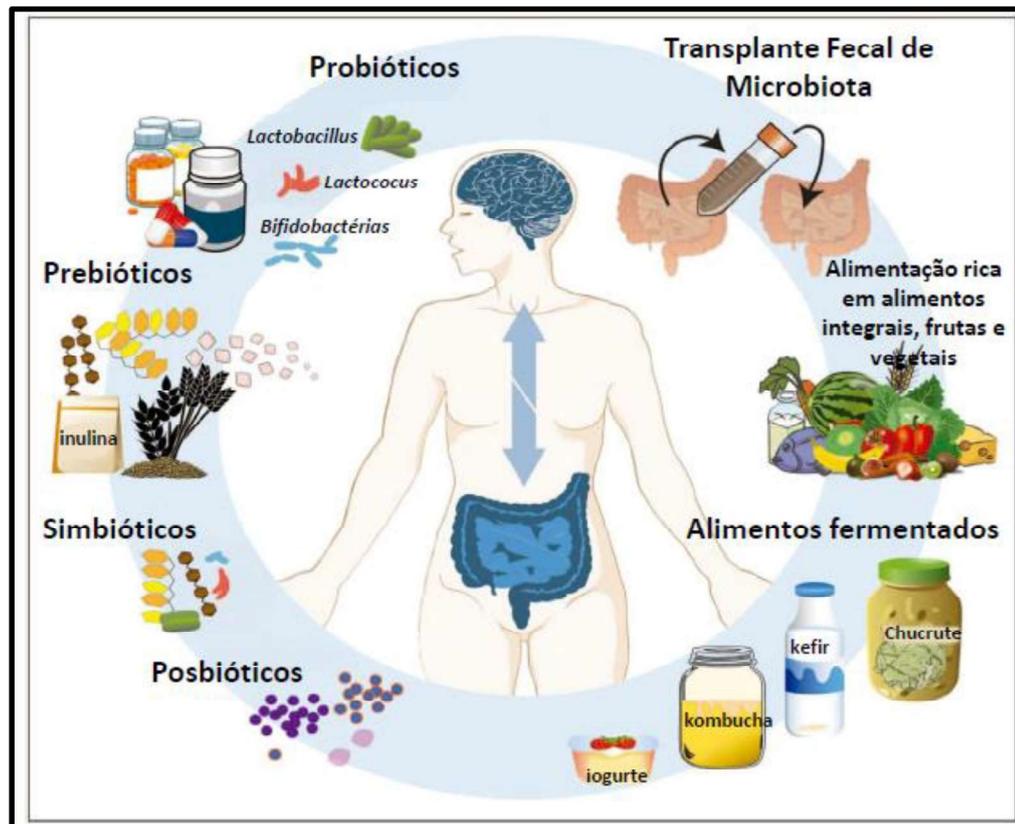


Figura 6: Adaptada de CRYAN et al., 2019 Alvos para manutenção/tratamento da integridade do eixo MIC. *Simbióticos (associação de pre e probióticos), *posbióticos (células bacterianas não viáveis, partes microbianas que quando administrados em doses corretas conferem benefícios a saúde).

Os efeitos positivos dos probióticos no tratamento da depressão foram relatados em vários ensaios clínicos e pré-clínicos randomizados controlados por comparação com antidepressivos, após esses resultados os probióticos foram classificados como “Psicobióticos” por apresentarem características ansiolíticas e antidepressivas (ABILDGAARD et al., 2017; AKKASHEH et al., 2016; BERDING; CRYAN, 2022; LIANG et al., 2015; PIRBAGLOU et al., 2016; WALLACE; MILEV, 2017).

Embora em menor escala que os estudos com probióticos, a ação dos prebióticos em auxiliar o crescimento das bactérias benéficas já residentes no intestino, também tem chamado atenção para o desenvolvimento de estudos do efeito de prebióticos ou componentes que exerçam essa ação: os quais incluem: frutooligossacarídeos (FOS), galactooligossacarídeo (GOS), inulina, polifenóis e ácidos graxos ômega-3, para o tratamento de sintomas depressivos. Apesar de poucos estudos os resultados encontrados também são animadores e esses prebióticos vem demonstrando eficácia positiva no eixo MIC (AZPIROZ et al., 2017; BUROKAS et al., 2017; DONOSO et al., 2019; MIKA et al., 2017; VIJAY et al., 2021).

Outra vertente recente de estudos para o tratamento do TDM são os alimentos fermentados que vêm demonstrando resultados positivos na integridade MI, o que é benéfico para a manutenção da integridade do eixo MIC (CARASI et al., 2015; MACHADO et al., 2013; VAN DE WOUW et al., 2020).

Em resumo, um desbalanço imunológico do eixo MIC por disbiose ou permeabilidade intestinal ocasiona uma produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias gerando neuroinflamação e ativando todas as vias imunológicas envolvidas no TDM como a hiperativação do eixo HPA, redução da síntese e metabolismo de monoaminas, aumento da apoptose neuronal, que afetam negativamente a neurogênese e a neuroplasticidade (BUTLER; CRYAN; DINAN, 2019; GRENHAM et al., 2011; PEREIRA et al., 2019).

Esse potencial demonstrado de reversão/atenuação dos sintomas depressivos via MI e eixo MIC, trouxe à luz novos alvos terapêuticos para o TDM. Entretanto, são necessários estudos que investiguem parâmetros imunológicos, endócrinos e metabólicos, bem como análises da composição da microbiota em grandes amostras.

1.8. MODELO DE COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)

Com a finalidade de investigar a relação entre as disfunções imunológicas e sintomas da depressão foram desenvolvidos alguns modelos pré-clínicos, que devem demonstrar que as citocinas pró-inflamatórias podem induzir comportamento semelhante à depressão em animais (DANTZER et al., 2008; KHAIROVA et al., 2009).

No entanto, a ocorrência de comportamento tipo depressivo induzido por citocinas traz um viés importante nesses experimentos, pois, alguns desses comportamentos se sobrepõem ao comportamento semelhante à depressão. Por exemplo, a redução na atividade motora que se desenvolve em indivíduos doentes imita o aumento da imobilidade que supostamente reflete o desamparo em situações inevitáveis, como nos testes de natação forçada e suspensão de cauda (DANTZER et al., 2008).

Da mesma forma, o apetite consideravelmente reduzido de animais doentes se traduz em uma diminuição da ingestão de alimentos recompensadores, que imita a anedonia associada à depressão, como no teste de preferência por sacarose (DANTZER, 2006; DANTZER et al., 2008).

Para elucidar o papel das citocinas na etiologia do TDM, é necessário mostrar que o comportamento do tipo depressivo em animais imunoestimulados se desenvolve independentemente de deficiências óbvias de desempenho (validação comportamental) e que é aliviado pelo tratamento antidepressivo (validação farmacológica) (DANTZER et al., 2008; POLLAK; REY; MONJE, 2010).

Um modelo de comportamento tipo depressivo amplamente utilizado é a administração dos indutores de liberação de citocinas inflamatórias como o lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina da membrana de bactérias gram-negativas (ADEBESIN et al., 2017; FRENOIS et al., 2007; JIANG et al., 2019; LIU et al., 2016a; WANG et al., 2014; YIRMIYA, 1996).

Após a injeção periférica do LPS, os animais desenvolvem um comportamento doente que leva à redução da atividade locomotora e exploração, o qual é seguido por um comportamento tipo depressivo (figura 7) (FRENOIS et al., 2007; PAINSIPP et al., 2011).

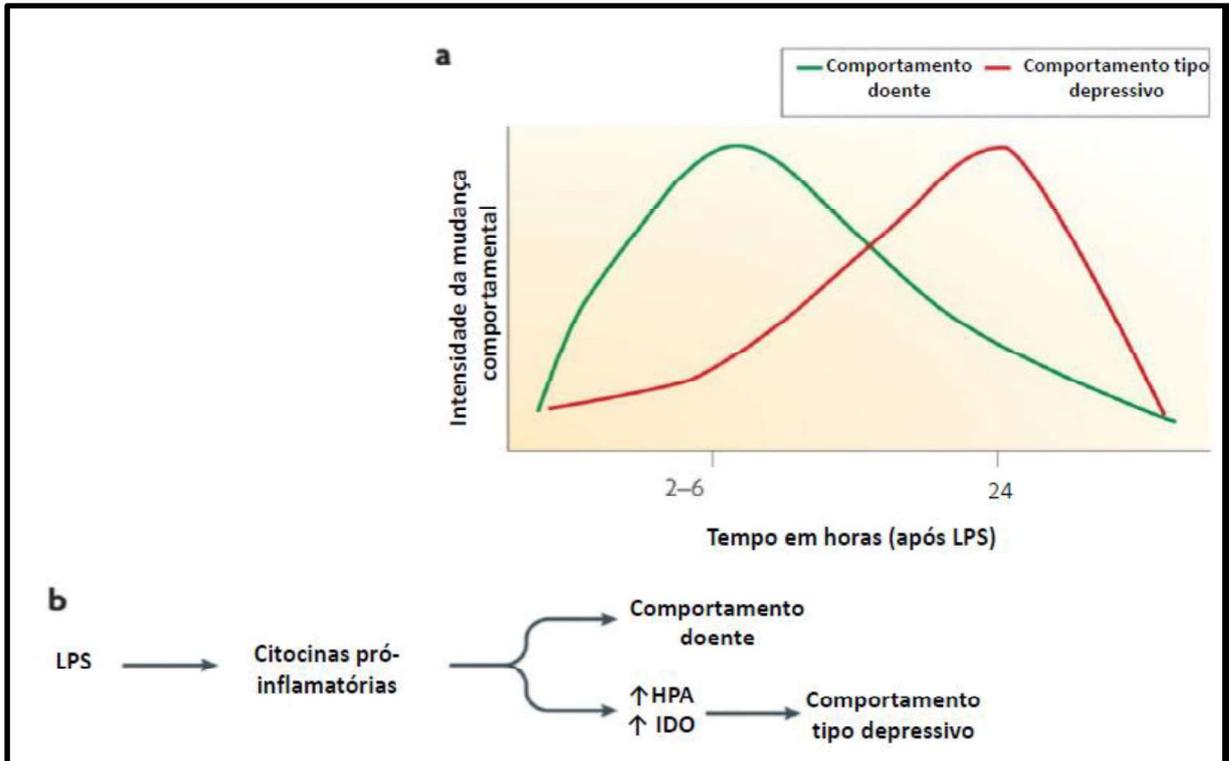


Figura 7: Adaptado de DANTZER et al., 2008 - Esquema da evolução do comportamento doente/depressivo em modelo animal com LPS. Ilustração da ocorrência do comportamento doente: na figura **a** o comportamento doente tem seu pico entre 2 a 6 horas após a administração do LPS, com redução expressiva após 12 horas, quando completa 24 horas essa resposta imune entra em queda sendo substituída pelo comportamento tipo depressivo, esse comportamento é mediado pela ativação da IDO e do eixo HPA conforme esquematizado na figura **b**.

Algumas indicações desse comportamento são demonstradas por experimentos nos quais animais tratados com LPS apresentaram maior imobilidade no teste de suspensão da cauda e no teste de natação forçada 24 horas após o tratamento, assim como uma diminuição no consumo de solução de bebida adoçada quando a ingestão de alimentos havia se normalizado (FRENOIS et al., 2007; LASSELIN et al., 2020; PAINSIPP et al., 2011).

Estas mudanças comportamentais podem ser provocadas pela ativação da enzima indoleamina-2-3-dioxigenase (IDO), a qual culmina em redução dos níveis centrais de serotonina (CARABELLI et al., 2020; O'CONNOR et al., 2009; WALKER et al., 2019). Após à administração do LPS, ocorre a indução de citocinas pró-inflamatórias, particularmente IL-1 β e IL-6, as quais ativam o eixo HPA que influencia a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) (BEISHUIZEN; THIJS, 2003) e diminuição

do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (LIU et al., 2016b; TANIGUTI et al., 2018; ZHU et al., 2015).

Em termos de validação farmacológica o pré-tratamento com antidepressivos/ outros ativos com ação anti-inflamatória anularam a ingestão reduzida de uma solução adoçada e tempo de imobilidade em testes de nado forçado e suspensão da cauda em animais tratados com LPS (ADEBESIN et al., 2017; JIANG et al., 2019; LIU et al., 2016a; YIRMIYA, 1996).

Esses achados em modelos animais confirmam a observação em humanos de que a ativação do sistema imunológico pode causar TDM, demonstrando assim ser uma ferramenta farmacológica importante nos estudos, pois, possui atuação em muitos mecanismos envolvidos na etiologia dessa desordem.

1.9. LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)

O LPS é um componente da membrana externa das bactérias gram-negativas; é um glicoconjugado formado por três regiões estrutural e geneticamente distintas: a porção chamada de lipídeo-A, o núcleo oligossacarídico e a região externa ou O-antígeno (figura 8) (RAETZ; WHITFIELD, 2002).

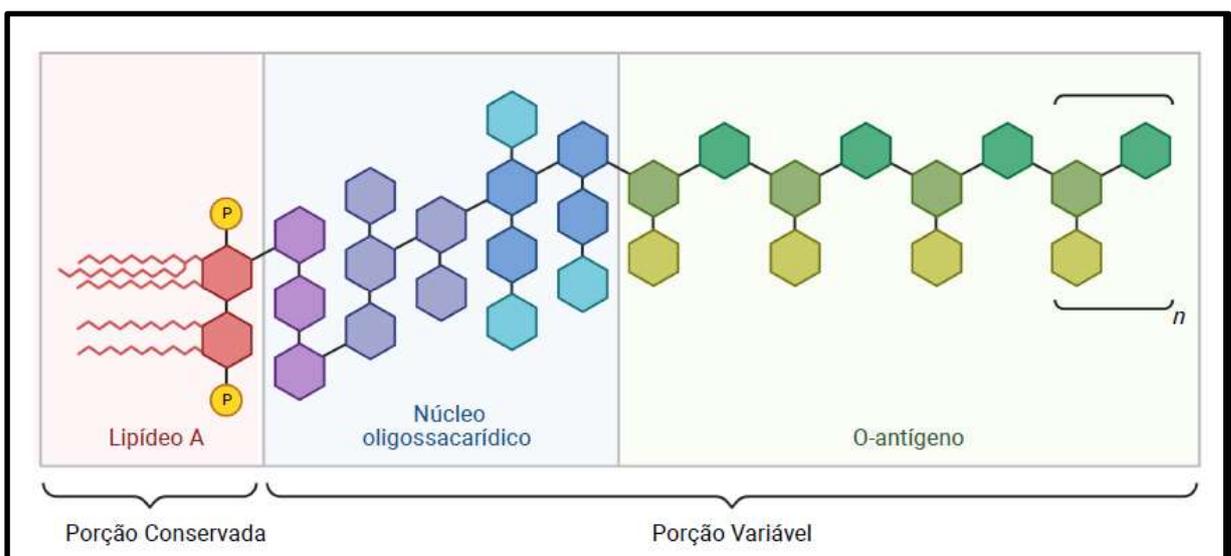


Figura 8: Estrutura do LPS (Criada com Biorender).

As cadeias de polissacarídeos se projetam a partir da membrana externa da bactéria em direção ao meio, e são covalentemente conectadas aos lipídios. A presença destas cadeias polissacarídicas na superfície celular promove proteção da região externa dessas bactérias contra a ação de lisozimas e antibióticos (SILIPO et al., 2010).

Esse glicoconjugado é chamado endotoxina por apresentar atividade citotóxica em células animais, essa toxicidade do LPS deve-se principalmente ao lípido A, enquanto os polissacarídeos são menos tóxicos. Em bactérias Gram-negativas, o LPS é ancorado à membrana externa via lípido A (RAETZ; WHITFIELD, 2002; SILIPO et al., 2010).

A porção O-antígeno geralmente é constituída de unidades oligossacarídicas repetitivas. A diversidade estrutural encontrada nos O-antígenos é imensa. Mais de 60 monossacarídeos e 30 diferentes substituintes já foram encontrados nessas estruturas (RAETZ; WHITFIELD, 2002).

O LPS é uma endotoxina que ativa o sistema imune inato através de seu reconhecimento como um Padrão molecular associado a patógeno (PAMP), via receptores transmembrana do tipo Toll (TLRs), no caso do LPS em específico esse reconhecimento ocorre a partir do receptor TLR4 que ativa uma via de sinalização que desencadeia resposta imunológica através da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (figura 9) (DANTZER, 2006; SILIPO et al., 2010).

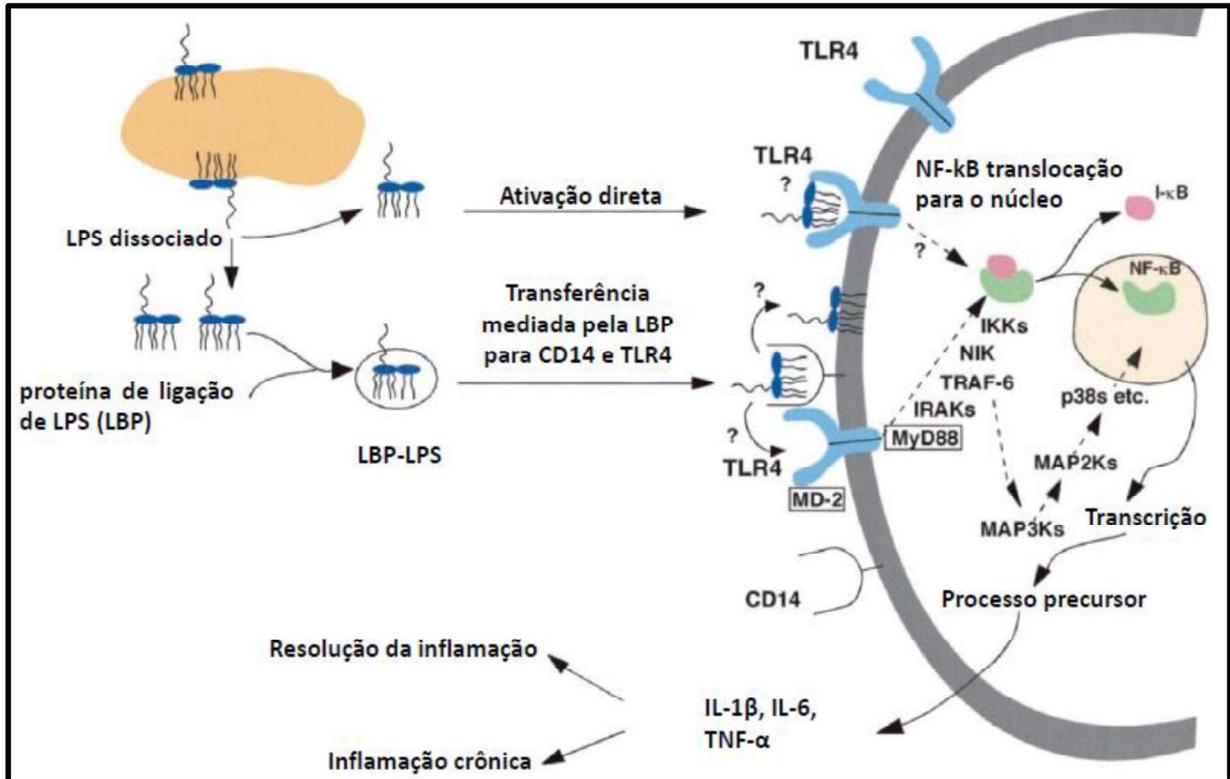


Figura 9: Adaptada de (RAETZ; WHITFIELD, 2002): Ativação imunológica mediada por LPS. O LPS dissociado da bactéria Gram negativa é reconhecido de forma direta pelo receptor TLR4 ou por mediação da proteína ligadora de LPS (LBP-LPS), que forma um complexo LBP-LPS que vai ser reconhecido pelo TLR4 por ação da glicoproteína de membrana CD14 que é uma molécula que atua como co-receptor do TLR4. Esse reconhecimento ativa a via de sinalização do NF-κB resultando na transcrição de citocinas pró-inflamatórias como IL-1β, IL-6, TNF-α, o que culmina em uma resposta imunológica adaptativa que é sucedida em um comportamento doente transitório a resolução do processo infeccioso e essa produção de citocinas quando cronicamente estimuladas podem levar a sintomas depressivos.

1.10. ALIMENTOS FERMENTADOS

A fermentação de alimentos é um dos métodos de preservação mais antigos e amplamente utilizados em todo o mundo tanto de forma residencial ou comercial, os alimentos fermentados são definidos como “alimentos ou bebidas produzidos através do crescimento microbiano controlado e da conversão de componentes alimentares através da ação enzimática” (DIMIDI et al., 2019).

Além disso, o consumo desses alimentos vem crescendo nos últimos anos, devido aos seus efeitos benéficos associados a saúde (BERDING; CRYAN, 2022), e devido

a isso estes alimentos têm despertado interesse. Seus benefícios são atribuídos aos seus microrganismos existentes, que realizam conversões enzimáticas no processo de fermentação gerando prebióticos, microrganismos vivos e metabólitos favoráveis à saúde, os quais vêm sendo investigados (BERDING; CRYAN, 2022).

Neste contexto, trabalhos sugerem benefícios para a saúde cerebral advindos de alimentos fermentados, como cepas probióticas, ácidos graxos de cadeia curta, flavonoides, lactoferrina, vitaminas e fitoquímicos, os quais através da fermentação geram metabólitos que auxiliam na redução do estresse oxidativo e inflamação (CEAPA et al., 2013; MACHADO et al., 2013; SELHUB; LOGAN; BESTED, 2014; TILLISCH et al., 2013).

1.10.1. Kombucha

Dentre os diversos alimentos fermentados com propriedades medicinais, destaca-se a kombucha (KT), uma bebida fermentada, provavelmente originária da China que foi muito consumida durante a dinastia Qin cerca de 220 a.C, em função das suas propriedades desintoxicantes e energizantes (DIMIDI et al., 2019; DUFRESNE; FARNWORTH, 2000). Em 414, o Doutor Kombu levou o kombucha da Coreia para o Japão para curar os problemas digestivos do Imperador (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000) . Relatos históricos indicam que essa bebida foi introduzida na Rússia por comerciantes orientais e posteriormente se difundiu na Europa Oriental e Europa (AMARASINGHE; WEERAKKODY; WAISUNDARA, 2018; DUFRESNE; FARNWORTH, 2000).

Além disso, essa bebida é originalmente obtida da fermentação de chá verde ou preto (*Camellia sinensis*) adoçado, por uma associação simbiótica de bactérias e leveduras, acomodadas em uma matriz de celulose sintetizada por bactérias acéticas denominada SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts) (VILLARREAL-SOTO et al., 2018), que é caracterizada pelo seu sabor ligeiramente doce e ácido (SENGUN; KIRMIZIGUL, 2020). Os microrganismos encontrados no SCOBY consistem principalmente em leveduras (*Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*), bactérias acéticas (*Acetobacter*, *Gluconobacter*) e ácido lácticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*); essa composição microbiana varia nos diferentes estágios de fermentação. Além

disso, a composição microbiana da cultura pode variar de acordo com sua origem, bem como, variações das condições de fermentação como concentração de oxigênio, temperatura, tempo, fonte do inóculo, tipo e concentração de açúcar (DIMIDI et al., 2019).

O processo de fermentação da kombucha é aeróbico e envolve fermentações alcoólica, láctica e acética, e leva de 7 a 10 dias ou mais à temperatura ambiente (figura 10) (SENGUN; KIRMIZIGUL, 2020). Esse processo ocorre de forma natural, enzimas invertases produzidas por algumas leveduras, clivam a sacarose em glicose e frutose. As leveduras, por sua vez, convertem a glicose em etanol e dióxido de carbono. O dióxido de carbono reage com a água formando ácido carbônico (SENGUN; KIRMIZIGUL, 2020; VILLARREAL-SOTO et al., 2018). Bactérias e algumas leveduras oxidam parte do etanol, produzindo ácido acético. Além disso, enquanto uma quantidade substancial de frutose permanece não fermentada, ácido glucônico e ácido acético são produzidos através da oxidação da glicose (SENGUN; KIRMIZIGUL, 2020; VILLARREAL-SOTO et al., 2018).

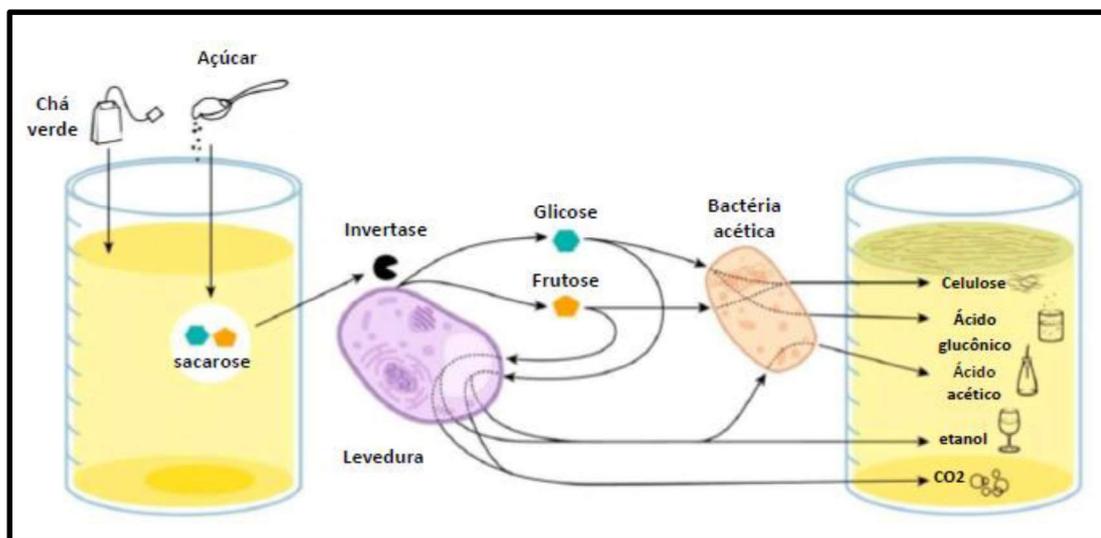


Figura 10: Adaptado de TRAN et al., 2020 Preparo e metabólitos do processo fermentativo do KT.

Com isso, durante a fermentação da kombucha, o pH do chá é inicialmente em torno de 5 diminui, devido ao aumento da concentração de ácido acético e outros ácidos (SENGUN; KIRMIZIGUL, 2020; VILLARREAL-SOTO et al., 2018). Esse pH reduzido demonstrou efeito antimicrobiano, pois a KT preveniu o crescimento de bactérias

patogênicas como *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Campylobacter jejuni* (SREERAMULU; ZHU; KNOL, 2000).

Em relação à sua composição, na kombucha, são encontrados compostos fenólicos, ácidos orgânicos, vitaminas, minerais, aminoácidos, proteínas, etanol, algumas enzimas hidrolíticas, dióxido de carbono, cepas bacterianas, leveduras e outros metabólitos microbianos (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000; VILLARREAL-SOTO et al., 2018). Devido a essa composição a KT demonstrou inúmeras atividades biológicas em animais como: ação na redução da glicemia em animais diabéticos (ALOULOU et al., 2012), efeito antioxidante em diferentes órgãos como pâncreas, fígado, rim e coração de ratos diabéticos, com restauração das alterações fisiopatológicas induzidas por aloxano (BHATTACHARYA; GACHHUI; SIL, 2013), efeito hipocolesterolêmico devido a atividade antioxidante da KT (BELLASSOUED et al., 2015).

Efeitos da KT em função da composição do seu microbioma também começam a ser correlacionados com sua ação, no estudo de JUNG et al. (2019), camundongos com esteatose que receberam o KT apresentaram redução significativa no acúmulo de gordura hepática e uma alteração na composição de sua microbiota aumentando a proporção de *Bacteroidetes* quando comparados com os animais com esteatose que não receberam KT, com isso os autores chegaram à conclusão de que essa alteração na microbiota pode ser um mecanismo de ação protetor da KT.

Em um estudo recente realizado por WANG et al. (2021) que avaliaram o efeito da KT na sepse induzida por LPS em camundongos, com o objetivo de elucidar potenciais mecanismos envolvidos em seu efeito anti-inflamatório e na MI, encontrou resultados de efeito imunomodulador significativos desse tratamento, como: melhora da taxa de sobrevivência em até 40%, melhora da termorregulação, redução de TNF- α , IL-1 β e IL-6, restauraram os níveis de células T e macrófagos, inibiu a sinalização do NF- κ B e alterou a diversidade da MI, promovendo um crescimento de bactérias produtoras de butirato que é um ácido graxo de cadeia (AGCC) curta que exerce efeito anti-inflamatório.

Nos últimos anos, essa bebida tornou-se bastante popular em todo o mundo pela alegação de sua ação promotora de saúde (SENGUN; KIRMIZIGUL, 2020). Nos Estados Unidos, existem cerca de 134 empresas que produzem e comercializam KT, sendo que em 2018 esse mercado movimentou 1,5 bilhão de dólares, e estima-se que, em 2025, esse valor alcance em torno de 5 milhões (WANG et al., 2021). O Brasil possui legislação instituída pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) que dispõe sobre os padrões de identidade e qualidade das KT produzidas e comercializadas no país, através da Instrução Normativa nº 41/2019 (BRASIL, 2019).

O crescente consumo de KT, seja por preparo artesanal ou através de aquisição no mercado, traz a necessidade de realizar mais estudos pré-clínicos e clínicos para investigar seus benefícios e mecanismos envolvidos no mesmo.

1.11. JUSTIFICATIVA

Considerando i) que o TDM tem alta prevalência e importante impacto na redução da qualidade de vida e comprometimento funcional dos acometidos, além do grande impacto econômico, ii) que os tratamentos atualmente disponíveis não são totalmente eficazes e iii) o envolvimento da desregulação do sistema imune na etiologia e piora dessa desordem, faz-se necessário o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para sua prevenção e/ou tratamento. Devido à sua capacidade antioxidante e antiinflamatória, a ingestão da kombucha pode trazer benefícios para a prevenção/tratamento do TDM, através da regulação da neuroinflamação.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Avaliar o efeito do tratamento com KT nas alterações comportamentais induzidas pelo LPS em camundongos machos e fêmeas adultos.

2.2. ESPECÍFICOS

I. Caracterizar o perfil de metabólitos do chá verde base de preparo da KT, KT e KT liofilizado utilizado para tratamento dos camundongos por HPLC.

II. Avaliar o efeito do tratamento com KT na atividade locomotora através do teste de campo aberto (CA);

III. Avaliar o efeito do tratamento com KT no comportamento tipo depressivo/ansioso induzidos pelo LPS em camundongos através dos testes de suspensão da cauda (TSC) e caixa claro/escuro (CCE);

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Para os experimentos foram usados camundongos machos (n = 67) e fêmeas (n = 70) da linhagem C57BL/6J com idade de 10 a 12 semanas, sendo o peso das fêmeas de (19 a 22 g) e machos (20 a 26 g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), alojados em uma sala com controle de temperatura (24°C), umidade de 50 a 60%, com 20 trocas de ar por hora e ciclo claro-escuro de 12:12h iniciando às 7h. A quantidade mínima de camundongos alojados por gaiola foi de 3 animais e a máxima de 5 animais, todos os animais foram aclimatados na sala de experimentação por 2 semanas antes do início dos experimentos e eram manipulados durante esse período, e tinham seu peso aferido diariamente. Todos os sujeitos experimentais receberam água e ração comercial *ad libitum* que eram repostas a cada três dias, juntamente com as trocas de maravalha efetuadas nesse período. Os experimentos realizados foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA/UFES) pelo protocolo de número (37/2019). (DU SERT et al., 2020).

3.2. KOMBUCHA

A KT utilizada para os experimentos foi fornecida pela empresa de preparo artesanal “Kombucha Viva o Dia”. Todos os insumos utilizados para o seu preparo eram orgânicos, com o intuito de obter um maior número de compostos bioativos/fitoquímicos. O processo de produção é padronizado e tem controle da

quantidade de insumos, temperatura entre 25 e 28 °C, monitoramento de pH, tempo de fermentação, coleta de amostras e lote de produção. O processo de preparo da bebida é segredo industrial, e o lote utilizado neste trabalho foi o número 234.

Os ingredientes utilizados para o preparo da KT foram: chá verde e açúcar orgânicos, SCOBY e caldo de iniciador (KT previamente fermentada). A mistura foi fermentada por 7 dias. Posteriormente, a KT fermentada foi congelada e armazenada a -80 °C antes de ser submetida à liofilização. Finalmente o extrato liofilizado de KT foi armazenado a -20 °C até o uso.

Os animais receberam 2 g/kg de KT liofilizado diluído em água filtrada por via oral, através de gavagem, a cada 24 horas durante 10 dias (Jung et al., 2019).

3.2.1. Caracterização do perfil metabólico do chá de *Camélia sinensis* e KT

O chá verde foi a base para o preparo da KT, portanto, foi realizada análise química para identificar o perfil de metabólitos presentes no chá base, KT e KT liofilizada.

Essa caracterização e seus resultados foram realizados em parceria com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), Ribeirão Preto (SP), Brasil, pela Dra. Amanda Mesquita Guiraldelli.

3.2.1.1. Preparação da solução de amostra

O chá verde e a KT foram filtrados através de uma membrana de PVDF com tamanho de poro de 0,22 µm. O KT liofilizado (em pó) foi preparado transferindo 2 mL de água sonicada para o pó e sonicada por 60 min em temperatura ambiente.

3.2.1.2. Caracterização de metabólitos por LC-UV-MS/MS

A análise foi realizada em equipamento Agilent UHPLC 1290 acoplado a um QToF 6540 no modo ESI (+), voltagem capilar de 3000 V, temperatura do gás definida em 300°C, temperatura do gás de dessolvatação em 300°C, fluxo de gás de dessolvatação definido em 11 L/min e fluxo de gás de cone a 10 L/min. Os dados

foram adquiridos no modo Data-Dependent Acquisition (DDA) dentro da faixa de massa de m/z 100-2000 considerando as 2 espécies iônicas mais intensas na varredura MS que foram selecionadas para MS/MS (CID: 10, 20, 30 eV) com configurações de ativação de exclusão de janela de 10 segundos. A fase móvel consistia em ácido fórmico 0,1% em água como solução A e acetonitrila como solução B usando o programa de gradiente como segue: 0-2 min, 5% B; 2-20 min, 5-100% B; 20-22 min, manter a 100% B; 22-22,1 min, 100-5% de B; 21,1-25 min, 5% de B. A coluna de fase reversa Waters BEH Shield RP 18 (100 mm x 2,1 mm x 1,7 μ m) foi usada estabelecendo a taxa de fluxo de 0,4 mL/min, temperatura da coluna a 25 °C, volume de injeção de 2 μ L e detecção a 220 nm.

3.3. LIPOPOLISSACARÍDEO

O Lipopolissacarídeo (LPS, sorotipo O111:B4, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) foi dissolvido em solução de NaCl 0,9% e administrado em dose única de 0.83 mg/kg via intraperitoneal (i.p.). A dose do LPS foi escolhida com base em estudos prévios avaliando as alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas por LPS em roedores (ADEBESIN et al., 2017; FRENOIS et al., 2007; O'CONNOR et al., 2009).

3.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em 4 grupos de acordo com o tratamento a receber:

Controle (C) - água vo + salina via i.p, **Kombucha (KT)** - kombucha vo + salina via i.p, **LPS** água vo + LPS via i.p, **Kombucha + LPS (LPS+KT)** - kombucha vo + LPS via i.p.

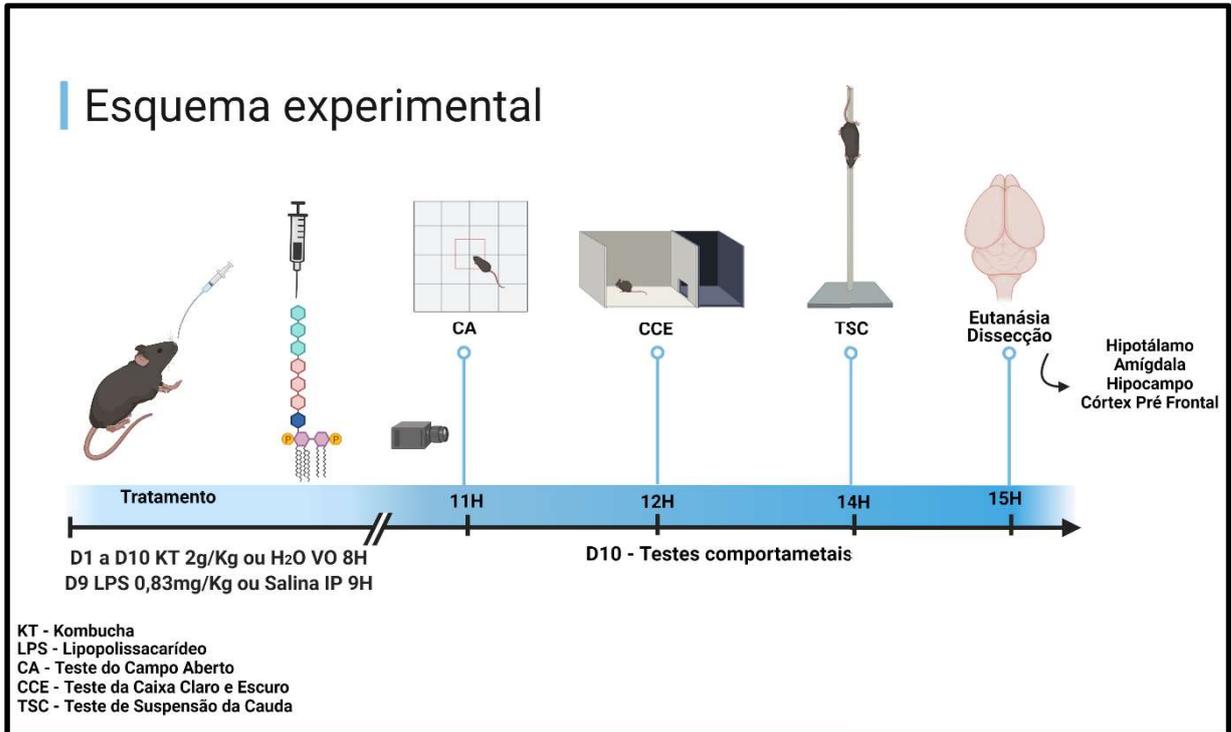


Figura 11: Delineamento experimental (Criada com Biorender).

3.5. TESTES COMPORTAMENTAIS

A avaliação comportamental ocorreu em etapas experimentais distintas para animais machos e fêmeas, e foi realizada em 3 baterias experimentais para cada sexo com n aproximado de 25 animais por bateria, com animais de todos os grupos experimentais. Os testes comportamentais foram realizados no décimo dia de tratamento dos camundongos, tendo seu início 24 horas após a aplicação do LPS, em uma sala de experimentação com isolamento acústico, sob luz vermelha. Os camundongos foram inicialmente habituados na sala de experimentação por uma hora e, posteriormente, submetidos aos testes individualmente, realizados na ordem do menos estressante para o mais estressante para reduzir a probabilidade de testes comportamentais anteriores influenciarem os subsequentes. Após a realização de cada bateria de testes, os aparatos eram higienizados com uma solução de álcool 70% para evitar a influência do cheiro nos testes seguintes.

3.5.1. Avaliação da atividade locomotora

- Teste do Campo Aberto (CA) - realizado às 11h - 26 horas após a administração do LPS

Cada animal foi gentilmente colocado em uma caixa de plástico branco (40 x 32 x 16 cm) onde foi permitido perambular livremente durante 5 minutos. Todas as sessões foram gravadas por uma câmera de vídeo posicionada acima da caixa para posteriores análises pelo software ANYMAZE (Stoelting Co., Wood Dale, IL). O parâmetro avaliado foi a distância percorrida total (MILLETT; PHILLIPS; SAUNDERS, 2019; WANG et al., 2019).

3.5.2. Avaliação do comportamento tipo depressivo/ansioso

- Teste de suspensão da cauda (TSC) - realizado às 14h - 29 horas após a administração do LPS

O TSC é um teste usado para avaliar comportamento do tipo depressivo (Can, Dao, Terrillion, et al., 2011). Neste teste, os camundongos foram suspensos pela cauda durante 6 minutos, em um aparato com 55 x 60 x 11,5 cm (altura x largura x profundidade), com quatro compartimentos. Cada camundongo foi suspenso dentro de seu próprio compartimento, com distância aproximada entre o nariz do animal e o base do aparato de 20-25 cm.

Todos os testes foram gravados por uma câmera frontal de vídeo para posterior análise. Neste teste foi analisado o tempo de imobilidade total do animal, nos 4 últimos minutos. O animal foi considerado imóvel quando não apresentava nenhum movimento do corpo e estava pendurado passivamente (CAN et al., 2011; WANG et al., 2019).

- Teste da caixa claro/escuro (CCE) - realizado às 12h - 27 horas após a administração do LPS

O CCE tem por objetivo prever à atividade ansiolítica ou ansiogênica, e se baseia no conflito que os camundongos enfrentam entre sua atração por novidades e sua aversão inata por arenas abertas e iluminadas (BOURIN; HASCOËT, 2003; SAVIGNAC et al., 2016). Os animais foram gentilmente colocados em um aparato com um compartimento escuro (14 × 7 × 9 cm) com uma passagem (3 × 4 cm) de acesso a um espaço aberto com intensidade iluminação ajustada em 50 lux (42 × 21 × 25 cm) durante 5 minutos. Foram avaliados os seguintes parâmetros: a latência para deixar a área escura, o número de transições entre os compartimentos, o tempo gasto na área clara e a distância percorrida na mesma. A entrada no compartimento foi considerada quando as 4 patas do animal estavam no mesmo. Os camundongos foram devolvidos às suas gaiolas no final do procedimento (SAVIGNAC et al., 2016). O teste foi gravado por uma câmera de vídeo posicionada acima da caixa claro/escuro para posterior análise pelo software ANYMAZE (Stoelting Co., Wood Dale, IL).

3.6. EUTANÁSIA

Ao final de cada bateria de experimentos os animais foram eutanasiados e os tecidos cerebrais (córtex, hipocampo, amígdala e hipotálamo) foram coletados, congelados e armazenados a -80°C, para futuras correlações de ensaios bioquímicos com os resultados da análise comportamental obtida.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra (n=19) foi estimado usando a seguinte fórmula: $n = [(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \cdot s^2 / \sigma^2]$. O teste baseia-se no cálculo do intervalo de confiança da diferença entre as médias (sigma), do desvio-padrão (s). $Z_{\alpha/2}$ – valor do erro α , usualmente: 1,96 (5%). Z_{β} – valor do erro β será fixado em 0,10 e o valor de z beta na tabela de valores de z (distribuição unicaudal) é 1,28. O valor da diferença entre as médias dos grupos como sendo pelo menos 30% e o valor do desvio padrão como sendo em média 40% do valor das médias, sendo estes valores obtidos através de experimentos previamente realizados (Apêndice A).

Todos os dados obtidos foram avaliados no software GraphPad Prism versão 8.00 (2020, San Diego, CA, USA). Inicialmente foi realizado o teste de normalidade de kolmogorov-smirnov para verificar a normalidade da amostra. Para analisar as

diferenças comportamentais entre os grupos foi empregada análise de variância ANOVA de duas vias. Os efeitos significativos dos fatores independentes foram seguidos pelo teste post-hoc de Bonferroni. Os animais considerados *outlier* pelo método de ROUT foram excluídos das análises. Para todas as análises foi aplicado um nível de significância de $p < 0.05$ e os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

4. RESULTADOS

4.1. PERFIL METABÓLICO DO CHÁ VERDE (*CAMELIA SINENSIS*) E KOMBUCHA

A análise química do chá *C. sinensis* e KT por espectrometria de massa permitiu identificar a presença de polissacarídeos, cafeína, taninos e flavonóides glicosilados (figura 12, tabela 1). A anotação do composto foi realizada a partir da massa exata, espectros de fragmentação MS/MS, espectros de UV e revisão de compostos químicos isolados de *C. sinensis*. Não foram observadas diferenças no perfil químico do chá para a KT (em solução ou liofilizada).

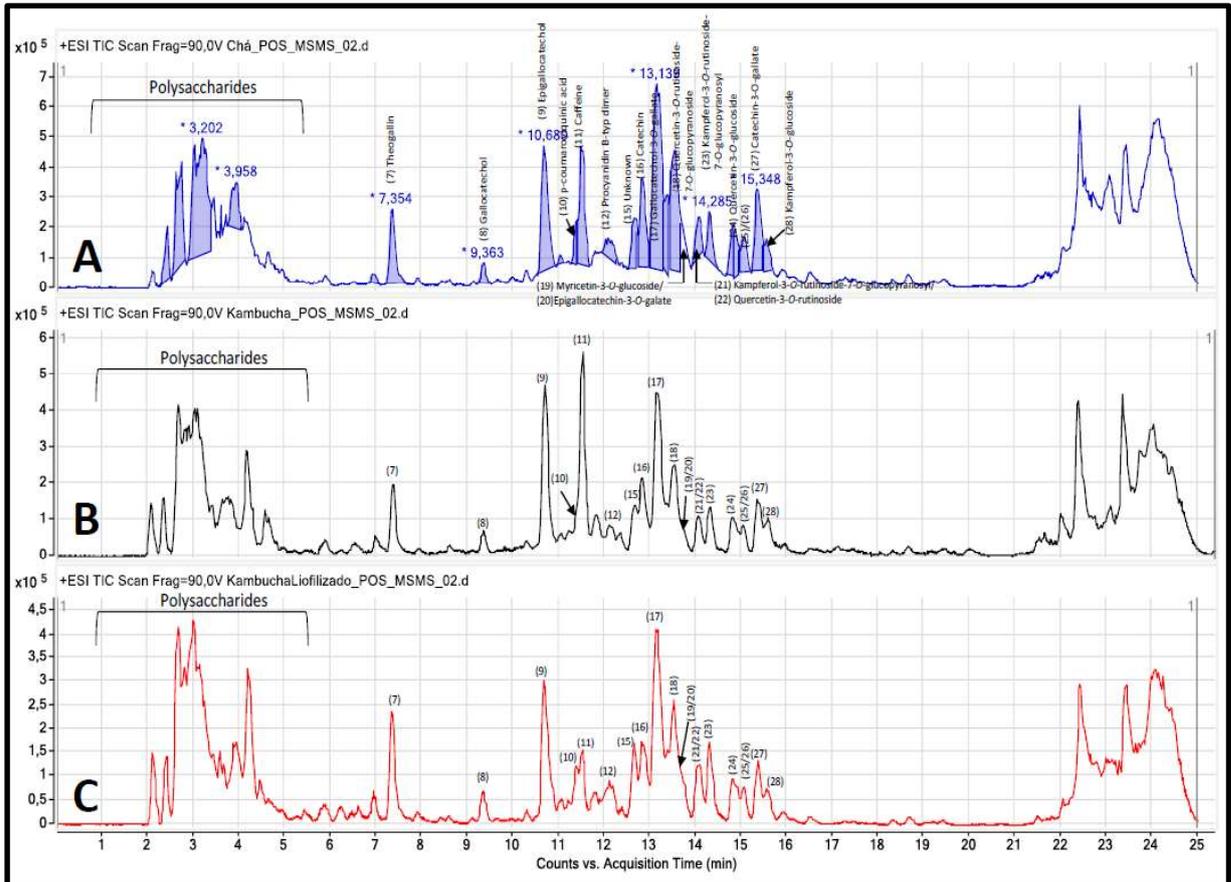


Figura 12: Cromatograma de íons totais do chá de *Camelia sinensis* e kombucha por análise LC-UV-MS/MS, em ionização de modo positivo. Nota: (A) chá *C. sinensis*; (B) solução de kombuchá; (C) kombucha liofilizado e reconstituído.

Tabela 1: Análise química qualitativa do chá *C. sinensis* e kombucha por análise LC-UV-MS/MS.

ID	TR (min)	Identidade Proposta	ESI(+) MS espectro m/z	ESI(+) MS espectro Espécies iônicas	Erro de massa (ppm)	Fórmula molecular proposta
1	2.84	Polissacarídeo	381.0798	[M+K-5Glc] ⁺	-	-
2	2.90	Polissacarídeo	381.0803	frag. na fonte	-	-
3	3.11	Polissacarídeo	381.0800	frag. na fonte	-	-
4	3.6	Desconhecida	175.1071	-	-	-
5	3.7	Polissacarídeo	381.0803	-	-	-
6	3.89	Desconhecida	337.1610	-	-	-
7	7.3	Teogalina	345.0817	[M+H] ⁺	-0.29	C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀
8	9.36	Galocatecol	307.0811	[M+H] ⁺	0.33	C ₁₅ H ₁₄ O ₇
9	10.68	Epigalocatecol	307.0818	[M+H] ⁺	-1.81	C ₁₅ H ₁₄ O ₇

10	11.38	Ácido p-cumaroilquínico	339.1068	[M+H] ⁺	1.77	C ₁₆ H ₈ O ₈
11	11.48	Cafeína	195.0873	[M+H] ⁺	-1.02	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂
12	12.1	Procianidina do tipo B dímero	579.1469	[M+H] ⁺	4.83	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂
13	12.2	Desconhecida	427.1703	-	-	-
14	12.3	Desconhecida	309.0729	-	-	-
15	12.6	Desconhecida	565.1561	[M+H] ⁺	-	-
16	12.83	Catequina	291.0865	[M+H] ⁺	-0.56	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
17	13.16	Galocatecol-3-O-galato	459.0932	[M+H] ⁺	-2.08	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁
18	13.48	Quercetina-3-O-rutinosídeo- 7-O-glicopiranosídeo	773.2136	[M+H] ⁺	-0.13	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁
19	13.56	Miricetina-3-O-glicosídeo	481.0981	[M+H] ⁺	-0.75	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃
20	13.5	Epigallocatequina-3-O-galato	459.0928	[M+H] ⁺	-1.31	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁
21	14.1	Kampferol-3-O-rutinosídeo- 7-O-glicopiranosil	757.2212	[M+H] ⁺	-3.43	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀
22	14.15	Quercetina-3-O-rutinosídeo	611.1632	[M+H] ⁺	-4.09	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
23	14.3	Kampferol-3-O-rutinosídeo- 7-O-glicopiranosil	757.2193	[M+H] ⁺	-0.92	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀
24	14.8	Quercetina-3-O-glicosídeo	465.1035	[M+H] ⁺	-1.51	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
25	15.1	Desconhecida	417.1320	[M+H] ⁺	-	-
26	15.15	Kampferol-3-O-rutinosídeo	595.1678	[M+H] ⁺	-3.53	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅
27	15.36	Catequina-3-O-galato	443.0981	[M+H] ⁺	-1.81	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀
28	15.59	Kampferol-3-O-glicosídeo	449.1074	[M+H] ⁺	0.89	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁

4.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO LPS E KOMBUCHA SOBRE A DISTÂNCIA PERCORRIDA NO CAMPO ABERTO

A atividade locomotora foi avaliada no teste de campo aberto. Os resultados obtidos em fêmeas mostram que o LPS induz uma hipolocomoção [efeito LPS: $F(1,65)=64,09$; $p<0,0001$; efeito KT: $F(1,65)=11,05$; $p=0,0015$; interação: $F(1,65)=2,826$; $p=0,096$], a qual é atenuada pela KT ($p=0,0035$, comparando LPS vs LPS+KT) (figura 13A). Essa redução da atividade locomotora pelo LPS também foi verificada nos machos (figura 13B) [efeito LPS: $F(1,61)=96,14$; $p<0,0001$; efeito KT: $F(1,61)=0,073$; $p=0,7879$; interação: $F(1,61)=2,416$; $p=0,1253$], entretanto, a KT não foi capaz de modificar a mesma.

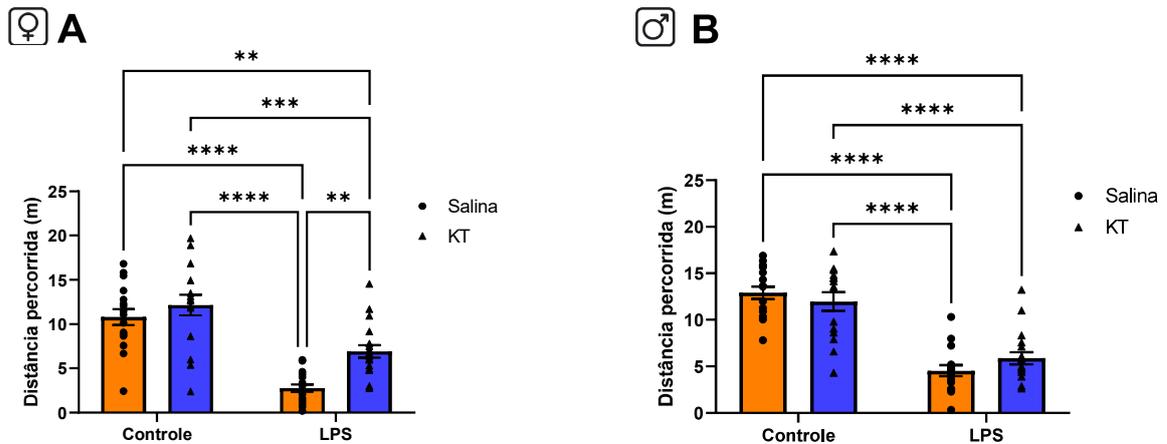


Figura 13: Efeito do tratamento com kombucha sobre a diminuição da atividade exploratória provocada pelo LPS no campo aberto. O painel A representa a distância percorrida em fêmeas: Controle (n=17), KT (n=16), LPS (n=17) e LPS+KT (n=19). O painel B representa a distância percorrida em machos: Controle (n=16), KT (n=15), LPS (n=17) e LPS+KT (n=18). Análise de variância ANOVA duas vias seguida do teste post-hoc de Bonferroni. # diferença entre os grupos tratados com LPS ou salina (i.p). **p=0,0035. Dados expressos como Média \pm erro padrão da média.

4.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO LPS E KOMBUCHA SOBRE O EFEITO TIPO ANSIOSO NA CAIXA CLARO ESCURO

O comportamento tipo ansioso foi avaliado na caixa claro-escuro. Os resultados obtidos nas fêmeas mostram que todos os parâmetros avaliados nessa tarefa não sofreram alteração entre os animais tratados com KT e salina e que não receberam LPS, demonstrando que a KT não exerce nenhum efeito *per se* nesse paradigma. Os dados apresentados na figura 14A demonstram que a latência para entrar no compartimento claro foi a mesma em todos os grupos analisados [efeito LPS: $F(1,62)=2,710$; $p=0,10480$; efeito KT: $F(1,62)=1,449$; $p=0,2332$; interação: $F(1,62)=3,521$; $p=0,0653$].

Ao analisar o tempo de exploração do ambiente claro (figura 14B) observou-se que os animais tratados com salina e que foram desafiados pelo LPS apresentaram uma redução significativa desse tempo que foi atenuado no grupo previamente tratado com

KT [efeito LPS: $F(1,65)=27,14$; $p<0,0001$; efeito KT: $F(1,65)=4,025$; $p=0,049$; interação: $F(1,65)=4,257$; $p=0,0431$].

O número de transições entre estas repartições (figura 14C) [efeito LPS: $F(1,66)=52,83$; $p<0,0001$; efeito KT: $F(1,66)=3,574$; $p=0,0631$; interação: $F(1,66)=13,06$; $p=0,006$], além da distância percorrida (figura 14D) [efeito LPS: $F(1,66)=54,32$; $p<0,0001$; efeito KT: $F(1,66)=5,096$; $p=0,0273$; interação: $F(1,66)=7,317$; $p=0,0087$] também seguiram a mesma tendência de redução no grupo LPS e mitigação desse comportamento no grupo tratado previamente com a KT.

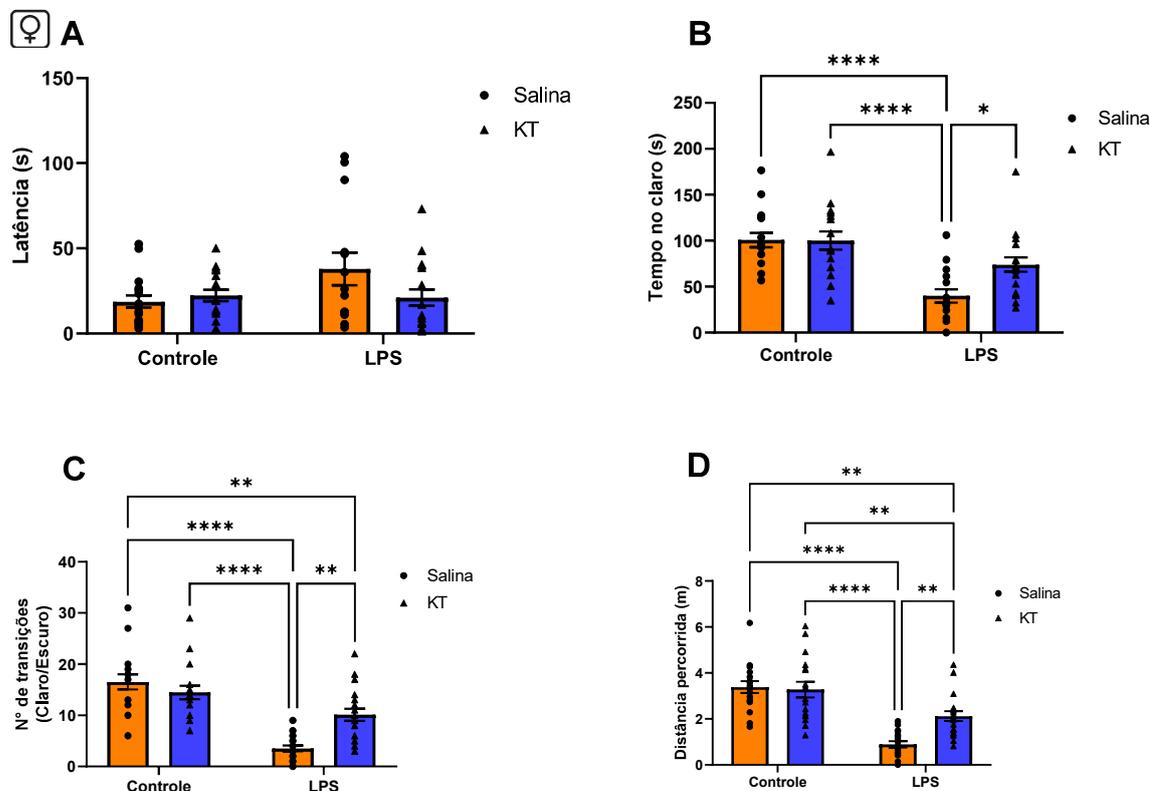


Figura 14 - Efeito do tratamento com Kombucha sobre o comportamento ansioso induzido pelo LPS em fêmeas: Tempo de latência para entrar no compartimento claro (painel 14A), tempo de exploração do compartimento claro (painel 14B), número de transições entre os dois compartimentos (painel 14C) e distância percorrida no compartimento claro (painel 14D). Controle (n=17), KT (n=17), LPS (n=14-17) e LPS+KT (n=18-19). Análise de variância ANOVA duas vias seguida do teste post-hoc de Bonferroni quando apropriado. # diferença entre os grupos tratados com LPS ou salina (i.p). * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$. Dados expressos como Média \pm erro padrão da média.

Nos machos (figura 15), o tratamento isolado com KT não apresentou diferenças com o grupo controle. Ademais, semelhante ao observado nas fêmeas, o tempo de latência para entrar no compartimento claro (figura 15A) foi o mesmo em todos os grupos analisados [efeito LPS: $F(1,58)=0,02867$; $p=0,8661$; efeito KT: $F(1,58)=0,9769$; $p=0,3271$; interação: $F(1,58)=6,988$; $p=0,0105$]. Além disso, também não houve diferença entre os grupos ao analisar o tempo de exploração do ambiente claro (figura 15B), [efeito LPS: $F(1,61)=0,5860$; $p=0,4469$; efeito KT: $F(1,61)=0,4321$; $p=0,5134$; interação: $F(1,61)=2,137$; $p=0,1489$], diferentemente do observado em fêmeas.

Entretanto, ao analisar o número de transições entre estas repartições (figura 15C) [efeito LPS: $F(1,63)=60,36$; $p<0,0001$; efeito KT: $F(1,63)=5,459$; $p=0,0227$; interação: $F(1,63)=1,343$; $p=0,2509$] e a distância percorrida (figura 15D) [efeito LPS: $F(1,63)=22,49$; $p<0,0001$; efeito KT: $F(1,63)=4,212$; $p=0,0443$; interação: $F(1,63)=0,5948$; $p=0,4435$], observou-se que os animais tratados com salina e que foram desafiados pelo LPS apresentaram uma redução destes parâmetros, os quais se mantiveram no grupo previamente tratado com KT.

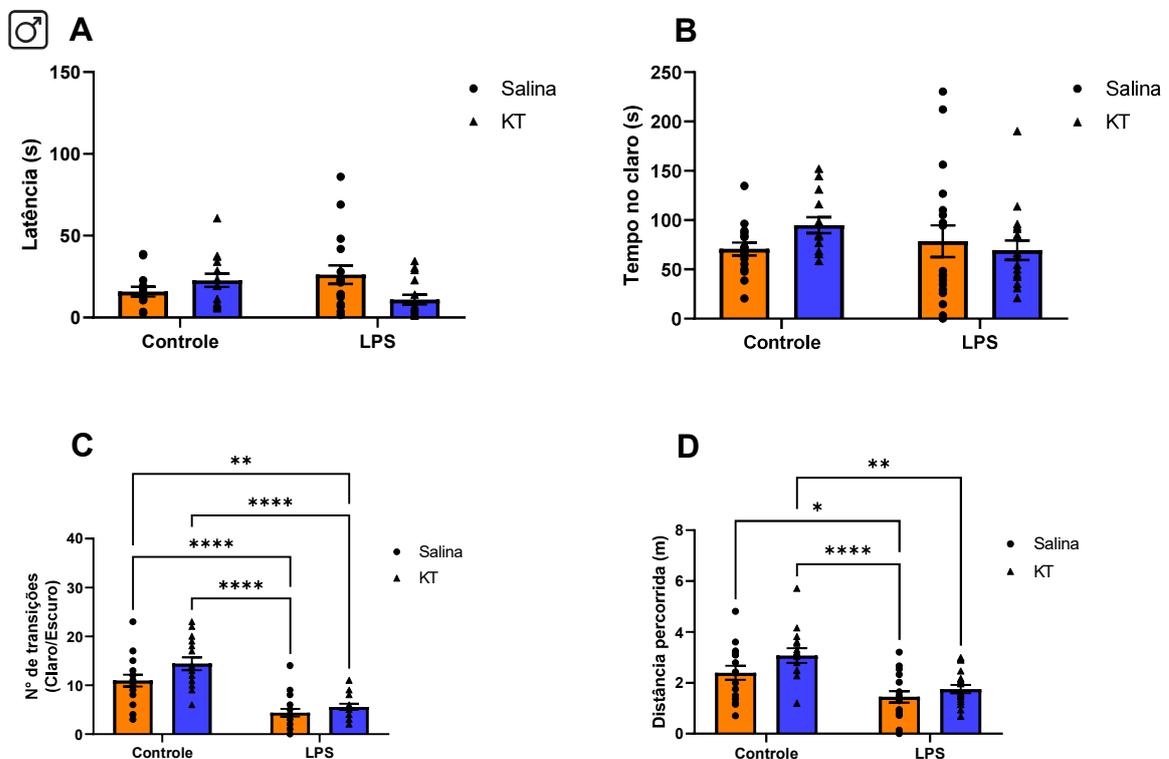


Figura 15: Efeito do tratamento com Kombucha sobre o comportamento ansioso induzido

pele LPS em machos: Tempo de latência para entrar no compartimento claro (painel A), tempo de exploração do compartimento claro (painel B), número de transições entre os dois compartimentos (painel C) e distância percorrida no compartimento claro (painel D). Controle (n=14-16), KT (n=14-15), LPS (n=17-18) e LPS+KT (n=16-18). Análise de variância ANOVA duas vias seguida do teste post-hoc de Bonferroni quando apropriado. # diferença entre os grupos tratados com LPS ou salina (i.p). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$. Dados expressos como Média \pm erro padrão da média.

4.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO LPS E KOMBUCHA SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO DEPRESSIVO NO TESTE DE SUSPENSÃO DA CAUDA

O comportamento tipo depressivo foi avaliado no teste de suspensão da cauda (figura 16). Nas fêmeas (figura 16A), foi observado que o tratamento com LPS induziu um aumento significativo no tempo de imobilidade que foi prevenido no grupo previamente tratado com KT [efeito LPS: $F(1,66)=5,771$; $p=0,0191$; efeito KT: $F(1,66)=13,64$; $p=0,0005$; interação: $F(1,66)=7,274$; $p=0,0089$]. Porém, para os machos (figura 16B) não foram verificadas diferenças entre os grupos [efeito LPS: $F(1,59)=0,07147$; $p=0,2043$; efeito KT: $F(1,59)=1,648$; $p=0,4805$; interação: $F(1,59)=0,5042$; $p=0,7901$].

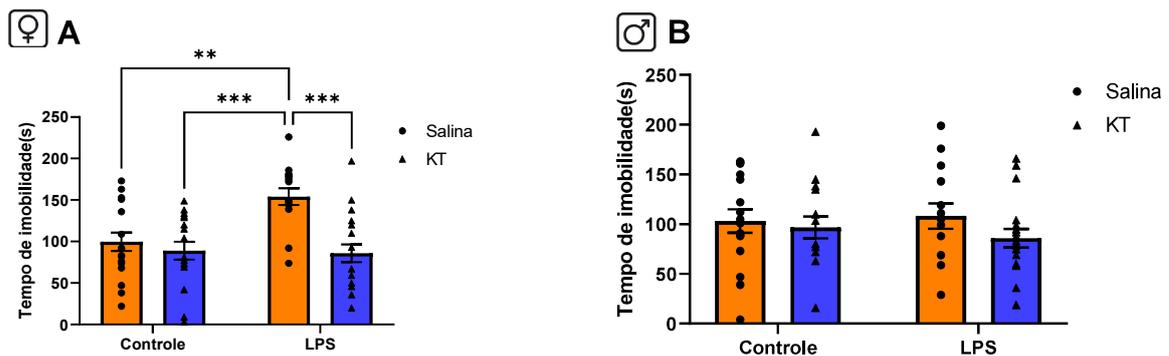


Figura 16: Efeito do tratamento com LPS e Kombucha sobre tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda. O painel A representa o tempo de imobilidade em fêmeas: Controle (n=17), KT (n=17), LPS (n=17) e LPS+KT (n=19). O painel B representa o tempo de imobilidade em machos: Controle (n=16), KT (n=15), LPS (n=14) e LPS+KT (n=18). Análise de variância ANOVA duas vias seguida do teste post-hoc de Bonferroni quando apropriado. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Dados expressos como Média \pm erro padrão da média.

5. DISCUSSÃO

A caracterização físico-química qualitativa da KT utilizada nesse estudo indica que a mesma possui em sua composição: polissacarídeos, cafeína, taninos e flavonóides glicosilados o que corrobora com os resultados encontrados em estudos que realizaram a caracterização físico-química da KT (AL-MOHAMMADI et al., 2021; GAGGIÀ et al., 2019; TRAN et al., 2020; VILLARREAL-SOTO et al., 2018), indicando que a KT utilizada nesse estudo possui metabólitos com os potenciais anti-inflamatório e antioxidante associados a essa bebida (GAGGIÀ et al., 2019; MALBAŠA et al., 2011; SALAFZON, 2017).

Além disso, a dose utilizada de KT neste estudo teve o potencial de atenuar a hipolocomoção e comportamento ansiogênico e prevenir o comportamento tipo depressivo induzidos pela administração sistêmica de LPS em fêmeas, porém, quando avaliados os mesmos parâmetros comportamentais em machos, esse consumo não minimizou os parâmetros de redução de locomoção e comportamento ansiogênico causados pelo LPS. Além disso, nesse grupo de animais em específico, o comportamento tipo depressivo não foi observado na dose de LPS utilizada.

A administração de LPS é amplamente utilizada em modelo animal de comportamento tipo depressivo por estimular o sistema imunológico, aumentando a produção de citocinas inflamatórias causando uma redução de monoaminas, principalmente serotonina e ativação do eixo HPA, gerando um “comportamento doente” com duração aproximada de 12 horas, possuindo um pico de ação entre 2 e 6 horas, após a administração do LPS (BIESMANS et al., 2013; FRENOIS et al., 2007; WANG et al., 2019; YIRMIYA, 1996). Além disso, trabalhos demonstraram que essas alterações causam o comportamento do tipo depressivo em animais que se torna presente após 24h da injeção com LPS, sem os efeitos de confusão do comportamento doente em camundongos (FRENOIS et al., 2007; FU et al., 2010; O’CONNOR et al., 2009).

Conforme demonstrado por diversos autores, o LPS causa uma redução da atividade locomotora (BIESMANS et al., 2013; MÜLLER et al., 2015; YIRMIYA, 1996), a qual foi observada tanto no experimento com fêmeas quanto com machos. A maioria dos estudos utilizando esse modelo de comportamento tipo depressivo demonstra que, após 24h, essa hipolocomoção causada pelo LPS é revertida de forma espontânea e

que a sua permanência após esse período estaria relacionada à manutenção do comportamento doente (BIESMANS et al., 2013; FRENOIS et al., 2007).

No presente estudo, o comportamento de hipolocomoção somente foi atenuado no grupo de fêmeas que consumiu o KT, semelhante ao estudo de MILLETT et. al. (2019) onde também foi observado comportamento de hipolocomoção em animais fêmeas após 24 horas de LPS.

Conforme demonstrado pelos resultados do presente trabalho, o tratamento de fêmeas com a kombucha na dose utilizada atenuou o decréscimo de locomoção induzido por LPS, enquanto nos animais machos esse tratamento não apresentou o mesmo efeito. Não foi encontrado, na literatura, qualquer estudo que tenha avaliado o efeito do consumo de kombucha na distância percorrida pelos animais experimentais, porém, o estudo de SINGAL et. al. (2004) avaliou esse parâmetro em animais tratados com chá verde, que é utilizado como base de fermentação da KT, e o resultado corrobora com o do presente trabalho em fêmeas, já que, Singal e colaboradores (2004) observaram que o chá verde atenuou a hipolocomoção causada pelo LPS.

Da mesma forma, o estudo de SUN et al., (2019), que avaliou o tratamento com probiótico *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolados do Kefir tibetano em modelo de comportamento tipo depressivo por estresse crônico imprevisível também atenuou as alterações de atividade locomotora, assim como nosso resultado em fêmeas.

Insta frisar que esse comportamento de hipolocomoção, 24h após o LPS, pode ser atribuído à redução de exploração por componente motivacional. Um dos sintomas maiores do TDM é a anedonia, assim, uma forma de associar essa hipolocomoção apresentada ao comportamento motivacional em animais seria a realização de testes para avaliar esse parâmetro, como o teste de preferência pelo açúcar. Um outro parâmetro nesse estudo que pode indicar que a hipolocomoção causada é associada a componente motivacional é que no TSC realizado em machos o parâmetro de imobilidade (motor) não demonstrou diferença entre os grupos.

Além disso, no estudo de YEH et al., (2015), após a administração do LPS, os ratos exibiram anedonia e redução de dopamina (DA), o que é associado a esse

comportamento. Ainda, alguns estudos que realizam avaliação de anedonia por esse teste mostram que o consumo reduzido da solução de sacarose se mantém por pelo menos 48h após o LPS (BIESMANS et al., 2013; DALLA et al., 2010; FRENOIS et al., 2007) o que poderia justificar a prevalência da hipolocomoção após 24h de administração do LPS. Um dos mecanismos que podem estar relacionados ao retardo na locomoção de caráter motivacional seria a redução da síntese de DA principalmente na região do estriado ocasionada pela ativação imune (FELGER; TREADWAY, 2017; YEH et al., 2015).

Quanto ao comportamento tipo depressivo avaliado pelo teste de suspensão da cauda, no experimento com fêmeas, foi possível observar que o LPS levou a um aumento significativo do tempo de imobilidade dos animais com relação aos demais grupos, o que caracteriza esse comportamento; a KT foi capaz de prevenir essa imobilidade causada pelo LPS. Em contrapartida, nos machos não foi possível verificar este incremento, assim, o comportamento tipo depressivo não foi reproduzido no TSC, pois, não houve diferença significativa do grupo controle para os demais grupos.

Para esse tipo de comportamento também não foi encontrado na literatura estudos associando kombucha e comportamento tipo-depressivo induzido por LPS. Mas, os estudos de LIU et al., 2013; RAI et al., 2019; SHEN et al., 2019, que utilizaram o modelo de estresse crônico imprevisível e trataram os animais com polifenóis presentes no chá verde, também encontraram efeito de redução/reversão do tempo de imobilidade desses animais. Ademais, nos estudos de SUN et al., 2019; XIANGJIE QIU, 2021, os animais foram tratados com cepas de *Lactobacillus* e apresentaram reversão do tempo de imobilidade causado pelo comportamento tipo depressivo, resultados esses que corroboram com o este estudo quando avaliado a reversão desse tipo de comportamento em fêmeas.

Além disso, a diferença encontrada entre fêmeas e machos no desenvolvimento de comportamento tipo depressivo corroboram com a literatura que descreve peculiaridades na resposta imunológica nos diferentes sexos, sendo as fêmeas mais propensas a desenvolver esse comportamento do que machos, pois, apresentam uma produção mais exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, maior ativação do eixo HPA e maiores alterações no metabolismo de serotonina (DALLA et al., 2010; DOCKMAN et al., 2022; LIMA et al., 2022).

Quanto a não reprodutibilidade do comportamento tipo depressivo em machos baseado no TSC é importante ressaltar que o tempo de imobilidade avaliado é um componente motor, como o TDM envolve uma gama de sintomas e dentre eles um dos mais robustos para o diagnóstico seria a anedonia, sendo a alteração dos sintomas motores um dos sintomas menores associados a esse transtorno, a avaliação desse parâmetro isolado para identificar esse tipo de comportamento vem sendo criticada (POLLAK; REY; MONJE, 2010), um importante parâmetro a ser avaliado em conjunto com testes que avaliam imobilidade para definir comportamento tipo depressivo seria associar esta análise aos testes que avaliam anedonia.

Ademais, quando avaliado o comportamento tipo ansioso pelo teste da caixa claro/escuro que tem como parâmetros mais importantes o número de transições entre compartimentos que indica atividade exploratória dos animais e o tempo gasto pelos animais no compartimento claro que reflete aversão (BOURIN; HASCOËT, 2003). Observamos que as fêmeas apresentaram um maior tempo de exploração e conseqüentemente uma maior distância percorrida no ambiente claro, assim como um maior número de transições entre a área clara e escura dos grupos LPS + KT com relação ao grupo LPS, o que demonstra uma ação ansiolítica do kombucha mitigando o efeito ansiogênico do LPS. Esse efeito ansiogênico do LPS também foi encontrado no estudo de SINGAL e colaboradores (2004), no qual o chá verde reverteu o tempo que os animais permaneceram nos braços fechados do labirinto em cruz elevada. Por sua vez, SAVIGNAC et al. (2016), que trataram os animais com o prebiótico galactooligosacarídeo (GOS) por 23 dias, observaram seu efeito ansiolítico nos parâmetros de latência para entrar no compartimento e tempo em que os animais permaneceram na área clara. Ambos os estudos, portanto, corroboram com os resultados observados para esse parâmetro em fêmeas.

Por outro lado, quando esses parâmetros foram avaliados em animais machos foi observado que o LPS exerceu efeito ansiogênico reduzindo o número de transições entre os compartimentos e, apesar de não ter efeito significativo no tempo que o animal permaneceu na área clara, a redução da distância percorrida nesse compartimento demonstra que os animais, apesar de permanecerem mais tempo nessa área, demonstraram atividade exploratória reduzida nesse compartimento; o tratamento com kombucha na dose estabelecida, não apresentou efeito na redução do comportamento tipo ansioso causado nos machos.

A diferença desse efeito entre fêmeas e machos pode ser decorrente de dimorfismo sexual. Além disso, existem diferenças farmacocinéticas para muitos fármacos e drogas entre os sexos em humanos e animais (LEGATES; KVARTA; THOMPSON, 2019; SRAMEK; MURPHY; CUTLER, 2016). Com isso, a resposta diferente ao tratamento com antidepressivos de diferentes classes em modelos pré-clínicos e clínicos entre homens e mulheres é relatada, as mulheres têm demonstrado melhor resposta aos ISRS e IMAO, enquanto os homens apresentaram uma melhor resposta aos TCAs (SRAMEK; MURPHY; CUTLER, 2016). Uma das hipóteses aventadas é que essa resposta diferente entre os sexos ocorre devido a diferenças no metabolismo de monoaminas e ativação do eixo HPA, associadas ao estrogênio (DALLA et al., 2010; LEGATES; KVARTA; THOMPSON, 2019; SRAMEK; MURPHY; CUTLER, 2016). No entanto, para conclusões mais acertadas, seria necessário correlacionar esses resultados com uma investigação bioquímica da resposta inflamatória causada pelo LPS entre os sexos, ciclo estral, monoaminas e ativação do eixo HPA desses animais.

Os efeitos positivos do consumo de kombucha nas alterações comportamentais causadas pelo LPS nesse estudo provavelmente se devem à sua rica composição de fitoquímicos e microbiota que, em sinergia, causam efeitos benéficos. O processo de fermentação aumenta o conteúdo de polifenóis e flavonóides em sua composição em relação ao quantitativo original do chá base (GAGGIÀ et al., 2019; JAYABALAN; MARIMUTHU; SWAMINATHAN, 2007; LEAL et al., 2018). Esse aumento de fitoquímicos presentes na bebida em decorrência de sua fermentação, torna o consumo de KT mais vantajoso quando comparado ao chá base de *C. sinensis*.

Não foram encontrados, na literatura, estudos relacionando kombucha e comportamento tipo depressivo, e por esse motivo as comparações deste trabalho se basearam em estudos com chá verde ou seus polifenóis, já que esse é o chá base utilizado para a KT utilizado nesse estudo e, como na literatura já é descrita a composição da microbiota dessa bebida, também utilizamos estudos envolvendo *Lactobacillus* e comportamento tipo depressivo.

Baseando-se em outros estudos com modelo de comportamento tipo depressivo mediado por LPS, o efeito antiinflamatório reversor desse comportamento foi

evidenciado pelo tratamento com diversos tipos de polifenóis como a quercetina, mangiferina, hesperidina e com o chá verde e cafeína, o que pode ser um indicativo da ação da KT utilizada nesse estudo nos resultados encontrados nas fêmeas (ASHOK JANGRAA, 2014; BASU MALLIK et al., 2016; SANGEETA PILKHWAL SAH, 2011; SINGAL; TIRKEY; CHOPRA, 2004).

Além disso, a KT possui uma microbiota diversificada que pode ter efeito benéfico para a saúde através da regulação da microbiota intestinal (SENGUN; KIRMIZIGUL, 2020). O uso de probióticos e prebióticos no modelo de comportamento tipo depressivo por LPS têm demonstrado efeitos positivos em reversão/melhora de suas alterações comportamentais e bioquímicas causadas em função da disfunção imunológica (CRYAN et al., 2019b; SAVIGNAC et al., 2016; XIANGJIE QIU, 2021). Portanto, as cepas presentes na KT podem ter tido ação reguladora das alterações comportamentais do LPS nas fêmeas através do seu potencial efeito no crescimento de uma microbiota comensal.

Ainda, no estudo de WANG et al., 2021 em um modelo de sepse induzida por LPS em camundongos tratados com KT durante 60 dias, foi observado uma maior taxa de sobrevivência dos animais em até 40%, uma importante redução de citocinas pró-inflamatórias, uma redução da ativação da via de sinalização do NF- κ B, assim como efeito na mudança da diversidade da microbiota, com aumento da abundância de Cyanobacteria e Alistipes que são associadas a redução de inflamação, sugerindo assim que a ação antidepressiva e ansiolítica apresentada pela KT nesse estudo pode ser decorrente da atenuação de regulação imune através da regulação das vias acima mencionadas.

Portanto, de acordo com a composição da KT e resultados de estudos descritos acima, avaliando parâmetros de comportamento tipo depressivo por LPS, a KT pode ter exercido seus efeitos na melhora das alterações comportamentais de camundongos fêmeas neste estudo através da ação anti-inflamatória mediada por efeito sinérgico de seus polifenóis e cepas bacterianas. Uma caracterização quantitativa e do microbioma do KT, assim como, uma correlação dos resultados com ensaios bioquímicos são necessárias para maiores elucidaciones. Além disso, a correlação bioquímica com o ciclo estral talvez possa elucidar componentes do

dimorfismo sexual observado tanto no modelo de comportamento utilizado, quanto na resposta das alterações comportamentais associadas ao consumo da KT.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo sugerem que a KT previne os comportamentos tipo-depressivos/ansiosos induzidos por LPS em camundongos fêmeas, porém, o mesmo resultado não foi encontrado nos animais machos nas doses utilizadas nesse estudo. A elucidação dos mecanismos pelos quais o KT promove esse benefício em um sexo em detrimento ao outro, traz a necessidade de investigar mecanismos bioquímicos envolvidos no metabolismo de monoaminas, ativação do eixo HPA e correlacionar com a ação dessa bebida, que também demanda uma caracterização mais ampla de seus metabólitos e análise do microbioma apresentado para maiores elucidações.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABILDGAARD, A. et al. Probiotic treatment reduces depressive-like behaviour in rats independently of diet. **Psychoneuroendocrinology**, v. 79, p. 40–48, 1 maio 2017.

ADAN, R. A. H. et al. Nutritional psychiatry : Towards improving mental health by what you eat. **European Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 12, p. 1321–1332, 2019.

ADEBESIN, A. et al. Methyl jasmonate attenuated lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviour in mice. **Journal of Psychiatric Research**, v. 94, p. 29–35, 2017.

AIZAWA, E. et al. Possible association of Bifidobacterium and Lactobacillus in the gut microbiota of patients with major depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, v. 202, p. 254–257, 15 set. 2016.

AKKASHEH, G. et al. Clinical and metabolic response to probiotic administration in patients with major depressive disorder: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Nutrition**, v. 32, n. 3, p. 315–320, 2016.

AL-MOHAMMADI, A. R. et al. Chemical constitution and antimicrobial activity of kombucha fermented beverage. **Molecules**, v. 26, n. 16, 2 ago. 2021.

ALOULO, A. et al. Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. 2012.

AMARASINGHE, H.; WEERAKKODY, N. S.; WAISUNDARA, V. Y. Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea Fungus” during extended periods of fermentation. n. January, p. 659–665, 2018.

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 5th edition (DSM-5). Arlington, VA, USA: **American Psychiatric Publishing, 2013.**

ANISMAN, H.; MERALI, Z.; HAYLEY, S. Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder: Comorbidity between depression and neurodegenerative disorders, **Progress in Neurobiology**, maio 2008.

ASHOK JANGRAA, M. M. L. K. S. C. B. M. L. Protective effect of mangiferin against lipopolysaccharide-induced depressive and anxiety-like behaviour in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 337–345, 2014.

AZPIROZ, F. et al. Effects of scFOS on the composition of fecal microbiota and anxiety in patients with irritable bowel syndrome: a randomized, double blind, placebo controlled study. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 29, n. 2, 1 fev. 2017.

BASSI, G. S. et al. Lipopolysaccharide-Induced Sickness Behaviour Evaluated in Different Models of Anxiety and Innate Fear in Rats. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 110, n. 4, p. 359–369, 2012.

BASU MALLIK, S. et al. Caffeic acid attenuates lipopolysaccharide-induced sickness behaviour and neuroinflammation in mice. **Neuroscience Letters**, v. 632, p. 218–223, 2016.

BAUER, M. E.; TEIXEIRA, A. L. Neuroinflammation in Mood Disorders: Role of Regulatory Immune Cells, **NeuroImmunoModulation** S. Karger AG, 1 ago. 2021.

BEISHUIZEN, A.; THIJS, L. G. Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis, **Journal of Endotoxin Research**, 2003.

BELLASSOUED, K. et al. Protective effect of kombucha on rats fed a hypercholesterolemic diet is mediated by its antioxidant activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 11, p. 1699–1709, 2015.

BERCIK, P.; COLLINS, S. M. The effects of inflammation, infection and antibiotics on the microbiota-gut-Brain axis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 817, p. 279–289, 2014.

BERDING, K.; CRYAN, J. F. Microbiota-targeted interventions for mental health. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 35, n. 1, p. 3–9, jan. 2022.

BHATTACHARYA, S.; GACHHUI, R.; SIL, P. C. Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 328–340, 2013.

BIESMANS, S. et al. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, 2013.

BONADIMAN, C. S. C. et al. Depressive disorders in Brazil: Results from the Global Burden of Disease Study 2017. **Population Health Metrics**, v. 18, 30 set. 2020.

- BORLAND, L. M.; MICHAEL, A. C. Voltammetric study of the control of striatal dopamine release by glutamate. **Journal of Neurochemistry**, v. 91, n. 1, p. 220–229, out. 2004.
- BOURIN, M.; HASCOËT, M. **The mouse light/dark box test** **European Journal of Pharmacology** Elsevier, , 28 fev. 2003.
- BROMET, E. et al. Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode. **BMC Medicine**, v. 9, 26 jul. 2011.
- BUROKAS, A. et al. Targeting the Microbiota-Gut-Brain Axis: Prebiotics Have Anxiolytic and Antidepressant-like Effects and Reverse the Impact of Chronic Stress in Mice. **Biological Psychiatry**, v. 82, n. 7, p. 472–487, 1 out. 2017.
- BUTLER, M. I.; CRYAN, J. F.; DINAN, T. G. Annual Review of Clinical Psychology Man and the Microbiome: A New Theory of Everything? **Annu. Rev. Clin. Psychol.**, 2019.
- CAN, A. et al. The tail suspension test. **Journal of Visualized Experiments**, n. 58, p. 3–7, 2011.
- CAPURON, L. et al. **Neurobehavioral Effects of Interferon-in Cancer Patients: Phenomenology and Paroxetine Responsiveness of Symptom Dimensions**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.acnp.org/citations/>.
- CARABELLI, B. et al. Fish-oil supplementation decreases Indoleamine-2,3-Dioxygenase expression and increases hippocampal serotonin levels in the LPS depression model. **Behavioural Brain Research**, v. 390, n. April, p. 112675, 2020.
- CARASI, P. et al. Impact of kefir derived lactobacillus kefiri on the mucosal immune response and gut microbiota. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, 24 fev. 2015.
- CASSANO, P.; FAVA, M. Depression and public health: an overview. **J Psychosom Res.** 2002 Oct;53(4):849-57. doi: 10.1016/s0022-3999(02)00304-5. PMID: 12377293.
- CEAPA, C. et al. Influence of fermented milk products, prebiotics and probiotics on microbiota composition and health. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v. 27, n. 1, p. 139–155, 2013.
- CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. **Nature**. 2001 Mar 1;410(6824):37-40. doi: 10.1038/35065000. PMID: 11242034.
- CRYAN, J. F. et al. The microbiota-gut-brain axis. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 4, p. 1877–2013, 2019b.
- DALLA, C. et al. Sex differences in animal models of depression and antidepressant response. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**. **Anais**. mar. 2010.
- DANTZER, R. Cytokine, Sickness Behavior, and Depression. **Neurologic Clinics**, ago. 2006.
- DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: When the immune system subjugates the brain. **Nature Reviews Neuroscience**, jan. 2008.

DANTZER, R. et al. Inflammation-associated depression: From serotonin to kynurenine. **Psychoneuroendocrinology**, abr. 2011.

DE BERARDIS D et al. The effect of newer serotonin-noradrenalin antidepressants on cytokine production: a review of the current literature. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 23, n. 2, p. 417–422, 2010.

DEGROOTE, S. et al. Maternal gut and fetal brain connection: Increased anxiety and reduced social interactions in Wistar rat offspring following peri-conceptual antibiotic exposure. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 71, p. 76–82, 2016.

DELUNGAHAWATTA, T. et al. Antibiotic driven changes in gut motility suggest direct modulation of enteric nervous system. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, n. OCT, 20 out. 2017.

DIMIDI, E. et al. Fermented foods: Definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease. **Nutrients** MDPI AG, 1 ago. 2019.

DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. **Gastroenterology Clinics of North America** W.B. Saunders, 1 mar. 2017.

DOBOS, N. et al. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in a mouse model of neuroinflammation-induced depression. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 28, n. 4, p. 905–915, 2012.

DOCKMAN, R. L. et al. Sex differences in behavior, response to LPS, and glucose homeostasis in middle-aged mice. **Behavioural Brain Research**, v. 418, 10 fev. 2022.

DONOSO, F. et al. Naturally Derived Polyphenols Protect Against Corticosterone-Induced Changes in Primary Cortical Neurons. **The international journal of neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 12, p. 765–777, 1 dez. 2019.

DOWLATI, Y. et al. A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. **Biological Psychiatry**, v. 67, n. 5, p. 446–457, 1 mar. 2010.

DU SERT, N. P. et al. The arrive guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. **PLoS Biology**, v. 18, n. 7, p. 1–12, 2020.

DUFRESNE, C.; FARNWORTH, E. Tea, Kombucha, and health: A review. **Food Research International**, v. 33, n. 6, p. 409–421, 2000.

EVRENSEL, A.; CEYLAN, M. E. The gut-brain axis: The missing link in depression. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience** Korean College of Neuropsychopharmacology, 1 dez. 2015.

FAKHOURY, M. New insights into the neurobiological mechanisms of major depressive disorders. **General Hospital Psychiatry**, v. 37, n. 2, p. 172–177, 2015.

FELGER, J. C.; TREADWAY, M. T. Inflammation Effects on Motivation and Motor Activity: Role of Dopamine. **Neuropsychopharmacology** Nature Publishing Group, 1 jan. 2017.

FENG, Q.; CHEN, W. D.; WANG, Y. D. Gut microbiota: An integral moderator in health and disease. **Frontiers in Microbiology** Frontiers Media S.A., 21 fev. 2018.

FRENOIS, F. et al. Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 5, p. 516–531, 2007.

FROLINGER, T. et al. The gut microbiota composition affects dietary polyphenols-mediated cognitive resilience in mice by modulating the bioavailability of phenolic acids. **Scientific Reports**, n. February, p. 1–10, 2019.

FU, X. et al. Central Administration of Lipopolysaccharide Induces Depressive-like Behavior in Vivo and Activates Brain Indoleamine 2,3 Dioxygenase In Murine Organotypic Hippocampal Slice Cultures. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, p. 1–12, 2010.

GAGGIÀ, F. et al. Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: A comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 1–22, 2019.

GRENHAM, S. et al. Brain-gut-microbe communication in health and disease. **Frontiers in Physiology**, v. 2 DEC, 2011.

HARRISON, N. A. et al. Inflammation Causes Mood Changes Through Alterations in Subgenual Cingulate Activity and Mesolimbic Connectivity. **Biological Psychiatry**, v. 66, n. 5, p. 407–414, 1 set. 2009.

HIRSCHFELD, R. M. A. The epidemiology of depression and the evolution of treatment. **Journal of Clinical Psychiatry** Physicians Postgraduate Press Inc., 2012.

HOBAN, A. E. et al. Behavioural and neurochemical consequences of chronic gut microbiota depletion during adulthood in the rat. **Neuroscience**, v. 339, p. 463–477, 17 dez. 2016.

HOWREN, M. B.; LAMKIN, D. M.; SULLS, J. Associations of depression with c-reactive protein, IL-1, and IL-6: A meta-analysis. **Psychosomatic Medicine**, v. 71, n. 2, p. 171–186, 2009.

JACOB, L.; ROCKEL, T.; KOSTEV, K. Depression Risk in Patients with Rheumatoid Arthritis in the United Kingdom. **Rheumatology and Therapy**, v. 4, n. 1, p. 195–200, jun. 2017.

JANELIDZE, S. et al. Cytokine levels in the blood may distinguish suicide attempters from depressed patients. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 2, p. 335–339, fev. 2011.

- JANSSEN, D. G. A. et al. A psychoneuroimmunological review on cytokines involved in antidepressant treatment response. **Human Psychopharmacology** John Wiley and Sons Ltd, 2010.
- JAYABALAN, R.; MARIMUTHU, S.; SWAMINATHAN, K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. **Food Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 392–398, 2007.
- JEON, S. W.; KIM, Y. K. The role of neuroinflammation and neurovascular dysfunction in major depressive disorder. **Journal of Inflammation Research** Dove Medical Press Ltd, 8 maio 2018.
- JIANG, X. et al. Fucoxanthin prevents lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice via AMPK- NF- κ B pathway. **Metabolic Brain Disease**, v. 34, n. 2, p. 431–442, 2019.
- KELLER, J. et al. HPA axis in major depression: Cortisol, clinical symptomatology and genetic variation predict cognition. **Molecular Psychiatry**, v. 22, n. 4, p. 527–536, 1 abr. 2017.
- KELLY, J. R. et al. Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. **Journal of Psychiatric Research**, v. 82, p. 109–118, 1 nov. 2016.
- KESSLER, R. C.; BROMET, E. J. The epidemiology of depression across cultures. **Annual Review of Public Health**, mar. 2013.
- KHAIROVA, R. A. et al. A potential role for pro-inflammatory cytokines in regulating synaptic plasticity in major depressive disorder. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, maio 2009.
- KITAGAMI, T. et al. Mechanism of systemically injected interferon-alpha impeding monoamine biosynthesis in rats: Role of nitric oxide as a signal crossing the blood-brain barrier. **Brain Research**, v. 978, n. 1–2, p. 104–114, 18 jul. 2003.
- KNORR, U. et al. Salivary cortisol in depressed patients versus control persons: A systematic review and meta-analysis. **Psychoneuroendocrinology**, out. 2010.
- KUEHNER, C. Why is depression more common among women than among men? **The Lancet Psychiatry** Elsevier Ltd, 1 fev. 2017.
- LASSELIN, J. et al. Comparison of bacterial lipopolysaccharide-induced sickness behavior in rodents and humans: Relevance for symptoms of anxiety and depression. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 115, n. April, p. 15–24, 2020.
- LEAL, J. M. et al. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. **CYTA - Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 390–399, 1 jan. 2018.
- LEGATES, T. A.; KVARTA, M. D.; THOMPSON, S. M. Sex differences in antidepressant efficacy. **Neuropsychopharmacology** Nature Publishing Group, 1 jan. 2019.

LI, W.; LUO, S.; WAN, C. Characterization of fever and sickness behavior regulated by cytokines during infection. **Behaviour Brill Academic Publishers**, 2020.

LIANG, S. et al. Administration of *Lactobacillus helveticus* NS8 improves behavioral, cognitive, and biochemical aberrations caused by chronic restraint stress. **Neuroscience**, v. 310, p. 561–577, 3 dez. 2015.

LIM, G. Y. et al. Prevalence of Depression in the Community from 30 Countries between 1994 and 2014 /692/699/476/1414 /692/499 article. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

LIMA, S. et al. The underestimated sex: A review on female animal models of depression. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 133, p. 104498, fev. 2022.

LIU, L. et al. Resveratrol counteracts lipopolysaccharide-induced depressivelike behaviors via enhanced hippocampal neurogenesis. **Oncotarget**, v. 7, n. 35, p. 56045–56059, 2016a.

LIU, Y. et al. Antidepressant-like effects of tea polyphenols on mouse model of chronic unpredictable mild stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 104, n. 1, p. 27–32, mar. 2013.

LIU, Y. et al. Similar Fecal Microbiota Signatures in Patients With Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome and Patients With Depression. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 11, p. 1602- 1611.e5, 1 nov. 2016b.

LOTFALIANY, M. et al. Depression and chronic diseases: Co-occurrence and communality of risk factors. **Journal of Affective Disorders**, v. 241, p. 461–468, 1 dez. 2018.

MACEDO, D. et al. Antidepressants, antimicrobials or both? Gut microbiota dysbiosis in depression and possible implications of the antimicrobial effects of antidepressant drugs for antidepressant effectiveness. **Journal of Affective Disorders**. Elsevier B.V., 15 jan. 2017.

MACHADO, A. et al. Microbiological , technological and therapeutic properties of kefir : a natural probiotic beverage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 349, n. 2, p. 341–349, 2013.

MALBAŠA, R. V. et al. Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1727–1731, 2011.

MALHI, G. S.; MANN, J. J. Depression **The Lancet** Lancet Publishing Group, , 24 nov. 2018.

MIKA, A. et al. Early life diets with prebiotics and bioactive milk fractions attenuate the impact of stress on learned helplessness behaviours and alter gene expression within neural circuits important for stress resistance. **European Journal of Neuroscience**, v. 45, n. 3, p. 342–357, 1 fev. 2017.

MILLER, A. H. Mechanisms of cytokine-induced behavioral changes: Psychoneuroimmunology at the translational interface. **Brain, Behavior, and Immunity**, fev. 2009.

- 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.
- MILLETT, C. E.; PHILLIPS, B. E.; SAUNDERS, E. F. H. The Sex-specific Effects of LPS on Depressive-like Behavior and Oxidative Stress in the Hippocampus of the Mouse. **Neuroscience**, v. 399, p. 77–88, 2019.
- MINTER, M. R. et al. Antibiotic-induced perturbations in gut microbial diversity influences neuro-inflammation and amyloidosis in a murine model of Alzheimer's disease. **Scientific Reports**, v. 6, 21 jul. 2016.
- MÜLLER, L. G. et al. Diene Valepotriates from *Valeriana glechomifolia* Prevent Lipopolysaccharide-Induced Sickness and Depressive-Like Behavior in Mice. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.
- O'CONNOR, J. C. et al. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. **Molecular Psychiatry**, v. 14, n. 5, p. 511–522, maio 2009.
- OMINIQUE, D. et al. Paroxetine for the prevention of depression induced by high-dose interferon alfa. **N Engl J Med**, v. 344, n. 13, 2001.
- PAINSIPP, E. et al. Prolonged depression-like behavior caused by immune challenge: Influence of mouse strain and social environment. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011.
- PARIANTE, C. M.; MILLER, A. H. REVIEW Glucocorticoid Receptors in Major Depression: Relevance to Pathophysiology and Treatment. **Biol Psychiatry**. 2001 Mar 1;49(5):391-404. doi: 10.1016/s0006-3223(00)01088-x. PMID: 11274650.
- PARK, A. J. et al. Altered colonic function and microbiota profile in a mouse model of chronic depression. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 25, n. 9, set. 2013.
- PEREIRA, C. et al. Depression's Unholy Trinity: Dysregulated Stress, Immunity, and the Microbiome. p. 1–30, 2019. *Annu Rev Psychol*. 2020 Jan 4;71:49-78. doi: 10.1146/annurev-psych-122216-011613. Epub 2019 Sep 30. PMID: 31567042.
- PESQUISA NACIONAL DE SAÚDE 2019: informações sobre domicílios, acesso e utilização dos serviços de saúde: Brasil, grandes regiões e unidades da federação / IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. - Rio de Janeiro: IBGE, 2020. 85p.
- PETRALIA, M. C. et al. The cytokine network in the pathogenesis of major depressive disorder. Close to translation? **Autoimmunity Reviews** Elsevier B.V., 1 maio 2020.
- PIRBAGLOU, M. et al. Probiotic supplementation can positively affect anxiety and depressive symptoms: a systematic review of randomized controlled trials. **Nutrition Research**. Elsevier Inc., 1 set. 2016.
- PITYCHOUTIS, P. M. et al. Neurochemical and behavioral alterations in an inflammatory model of depression: Sex differences exposed. **Neuroscience**, v. 159, n. 4, p. 1216–1232, 2009.

- PLOTSKY, P. M.; OWENS, M. J.; NEMEROFF, C. B. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. **The Psychiatric Clinics of North America** , v. 21, jun. 1998.
- POLLAK, D. D.; REY, C. E.; MONJE, F. J. Rodent models in depression research: Classical strategies and new directions. **Annals of Medicine**, 2010.
- RAETZ, C. R. H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**, 2002 :635-700. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414. Epub 2001 Nov 9. PMID: 12045108; PMCID: PMC2569852.
- RAI, A. et al. Catechin ameliorates depressive symptoms in sprague dawley rats subjected to chronic unpredictable mild stress by decreasing oxidative stress. **Biomedical Reports**, v. 11, n. 2, p. 79–84, 2019.
- RAISON, C. L. et al. Activation of Central Nervous System Inflammatory Pathways by Interferon-Alpha: Relationship to Monoamines and Depression. **Biological Psychiatry**, v. 65, n. 4, p. 296–303, 15 fev. 2009.
- RAISON, C. L. et al. Interferon- α effects on diurnal hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: Relationship with proinflammatory cytokines and behavior. **Molecular Psychiatry**, v. 15, n. 5, p. 535–547, maio 2010.
- RAISON, C. L.; CAPURON, L.; MILLER, A. H. Cytokines sing the blues: Inflammation and the pathogenesis of depression. **Trends in Immunology**, jan. 2006.
- REICHENBERG, A. et al. Cytokine-Associated Emotional and Cognitive Disturbances in Humans. **Arch Gen Psychiatry**. 2001 May;58(5):445-52. doi: 10.1001/archpsyc.58.5.445. PMID: 11343523.
- REICHENBERG, A. et al. Endotoxin-induced changes in food consumption in healthy volunteers are associated with TNF- α and IL-6 secretion. **Psychoneuroendocrinology**, v. 27, p. 945–956, 2002.
- RIVEST, S. Interactions between the immune and neuroendocrine systems. **Progress in Brain Research**, v. 181, n. C, p. 43–53, 2010.
- ROT, M. A. H.; MATHEW, S. J.; CHARNEY, D. S. Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. **Canadian Medical Association Journal**. Canadian Medical Association, 3 fev. 2009.
- RUIZ, N. A. L. et al. Inflammatory Process and Immune System in Major Depressive Disorder. **The international journal of neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 46–53, 12 jan. 2022.
- RUSH, A. J. et al. Comorbid psychiatric disorders in depressed outpatients: Demographic and clinical features. **Journal of Affective Disorders**, v. 87, n. 1, p. 43–55, jul. 2005.
- SALAFZON, S. Evaluation of the antioxidant impact of ginger-based kombucha on the murine breast cancer model. *J Complement Integr Med*. 2017 Oct 21;15(1):/j/jcim.2018.15.issue-1/jcim-2017-0071/jcim-2017-0071.xml. doi: 10.1515/jcim-2017-0071. PMID: 29055172.

- SANCHEZ, M. M. et al. Activated p38 MAPK is associated with decreased CSF 5-HIAA and increased maternal rejection during infancy in rhesus monkeys. **Molecular Psychiatry**, out. 2007.
- SANGEETA PILKHWAL SAH, N. T. A. K. K. C. Effect of quercetin on lipopolysaccharide induced-sickness behavior and oxidative stress in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 43, n. 2, 2011.
- SAVIGNAC, H. M. et al. Prebiotic administration normalizes lipopolysaccharide (LPS)-induced anxiety and cortical 5-HT_{2A} receptor and IL1- β levels in male mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 52, p. 120–131, 1 fev. 2016.
- SELHUB, E. M.; LOGAN, A. C.; BESTED, A. C. Fermented foods, microbiota, and mental health: Ancient practice meets nutritional psychiatry. **Journal of Physiological Anthropology**, v. 33, n. 1, p. 1–12, 2014.
- SENGUN, I. Y.; KIRMIZIGUL, A. Probiotic potential of kombucha. **Journal of Functional Foods**. Elsevier Ltd, 2020.
- SHEN, M. et al. L-theanine ameliorate depressive-like behavior in a chronic unpredictable mild stress rat model via modulating the monoamine levels in limbic–cortical–striatal–pallidal–thalamic-circuit related brain regions. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 2, p. 412–421, 1 fev. 2019.
- SILIPO, A. et al. Lipopolysaccharides. In: Prokaryotic Cell Wall Compounds: Structure and Biochemistry. Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 133–153.
- SILVA, M. T. et al. Prevalence of depression morbidity among Brazilian adults: A systematic review and meta-analysis. **Revista Brasileira de Psiquiatria** Associação Brasileira de Psiquiatria, 2014.
- SINGAL, A.; TIRKEY, N.; CHOPRA, K. Reversal of LPS-induced immobility in mice by green tea polyphenols: Possible COX-2 mechanism. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 9, p. 723–728, set. 2004.
- SLYKERMAN, R. F. et al. Antibiotics in the first year of life and subsequent neurocognitive outcomes. **Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics**, v. 106, n. 1, p. 87–94, 1 jan. 2017.
- SLYKERMAN, R. F. et al. Exposure to antibiotics in the first 24 months of life and neurocognitive outcomes at 11 years of age. **Psychopharmacology**, v. 236, n. 5, p. 1573–1582, 1 maio 2019.
- SRAMEK, J. J.; MURPHY, M. F.; CUTLER, N. R. Sex differences in the psychopharmacological treatment of depression. *Dialogues in clinical neuroscience*, 18(4), 447–457. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2016.18.4/ncutler>
- SREERAMULU, G. ; ZHU, Y.; KNOL, W. Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2589–2594, jun. 2000.

Tyring S et al. Etanercept and clinical outcomes, fatigue, and depression in psoriasis: double-blind placebo-controlled randomised phase III trial. **Lancet**. 2006 Jan 7;367(9504):29-35. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67763-X. PMID: 16399150.

STETLER, C.; MILLER, G. E. Depression and hypothalamic-pituitary-adrenal activation: A quantitative summary of four decades of research. **Psychosomatic Medicine**, v. 73, n. 2, p. 114–126, fev. 2011.

STOPA, S. R. et al. Pesquisa Nacional de Saúde 2019: histórico, métodos e perspectivas. **Epidemiologia e serviços de saúde: revista do Sistema Único de Saúde do Brasil**, v. 29, n. 5, p. e2020315, 2020.

SUN, Y. et al. Supplementation with *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 from Tibetan Kefir improves depression-like behavior in stressed mice by modulating the gut microbiota. **Food and Function**, v. 10, n. 2, p. 925–937, 1 fev. 2019.

TANIGUTI, E. H. et al. Neuroprotective effect of melatonin against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Physiology and Behavior**, v. 188, n. February, p. 270–275, 2018.

TILLISCH, K. et al. Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. **Gastroenterology**, v. 144, n. 7, p. 1394- 1401.e4, 2013.

TRAN, T. et al. Microbiological and technological parameters impacting the chemical composition and sensory quality of kombucha. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 4, p. 2050–2070, 1 jul. 2020.

TROUBAT, R. et al. Neuroinflammation and depression: A review. **European Journal of Neuroscience**, v. 53, n. 1, p. 151–171, 1 jan. 2021.

VAN DE WOUW, M. et al. Distinct actions of the fermented beverage kefir on host behaviour, immunity and microbiome gut-brain modules in the mouse. **Microbiome**, v. 8, n. 1, 18 maio 2020.

VERDUIJN, J. et al. Pathophysiology of major depressive disorder: Mechanisms involved in etiology are not associated with clinical progression. **Translational Psychiatry**, v. 5, n. 9, 29 set. 2015.

VIJAY, A. et al. The prebiotic effects of omega-3 fatty acid supplementation: A six-week randomised intervention trial. **Gut Microbes**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2021.

VILLARREAL-SOTO, S. A. et al. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 3, p. 580–588, 2018.

WALKER, A. K. et al. Leucine competes with kynurenine for blood-to-brain transport and prevents lipopolysaccharide-induced depression-like behavior in mice. **Molecular Psychiatry**, v. 24, n. 10, p. 1523–1532, 2019.

WALKER, W. A. **The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology Dysbiosis**. [s.l: s.n.].

WALLACE, C. J. K.; MILEV, R. The effects of probiotics on depressive symptoms in humans: A systematic review. **Annals of General Psychiatry**. BioMed Central Ltd., 20 fev. 2017.

WANG, P. et al. Kombucha ameliorates LPS-induced sepsis in a mouse model. **Food and Function**, v. 12, n. 20, p. 10263–10280, 21 out. 2021.

WANG, Y. et al. Inhibition of activated astrocyte ameliorates lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviors. **Journal of Affective Disorders**, v. 242, n. May 2018, p. 52–59, 2019.

WANG, Z. et al. The effects of curcumin on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. **Behavioural Brain Research**, v. 274, p. 282–290, 2014.

WICHERS, M. C. et al. IDO and interferon- α -induced depressive symptoms: A shift in hypothesis from tryptophan depletion to neurotoxicity. **Molecular Psychiatry**, v. 10, n. 6, p. 538–544, jun. 2005.

World Health Organization. WHO Global Burden of Disease (2008): 2004 Update. WHO, 2008.

World Health Organization. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. WHO, 2017.

WU, H. Q.; RASSOULPOUR, A.; SCHWARCZ, R. Kynurenic acid leads, dopamine follows: A new case of volume transmission in the brain? Journal of Neural Transmission. **Anais...**jan. 2007.

XIANGJIE QIU, G. W. L. W. Y. T. Z. S. Lactobacillus delbrueckii alleviates depression-like behavior through inhibiting toll-like receptor 4 (TLR4) signaling in mice. **Annals of Translational Medicine**. 2021.

YEH, K. Y. et al. Effect of Ginkgo biloba extract on lipopolysaccharide-induced anhedonic depressive-like behavior in male rats. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 2, p. 260–266, 2015.

YIRMIYA, R. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. **Brain Research**. ELSEVIER, 1996.

YOUNG, J. J.; BRUNO, D.; POMARA, N. A review of the relationship between proinflammatory cytokines and major depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**. Elsevier B.V., 1 dez. 2014.

YU, M. et al. Variations in gut microbiota and fecal metabolic phenotype associated with depression by 16S rRNA gene sequencing and LC/MS-based metabolomics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 138, p. 231–239, 10 maio 2017.

ZHENG, P. et al. Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism. **Molecular Psychiatry**, v. 21, n. 6, p. 786–796, 1 jun. 2016.

ZHU, C. BIN; BLAKELY, R. D.; HEWLETT, W. A. The proinflammatory cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha activate serotonin transporters. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 10, p. 2121–2131, 7 out. 2006.

ZHU, L. et al. Salidroside attenuates lipopolysaccharide (LPS) induced serum cytokines and depressive-like behavior in mice. **Neuroscience Letters**, v. 606, p. 1–6, 2015.

8. APÊNDICES

8.1. APÊNDICE A - Experimentos prévios realizados

8.1.1. Delineamento experimental

8.1.1.1. Experimento I – piloto

Esse experimento foi realizado com o objetivo de avaliar a reprodução do modelo experimental. Foram usados 16 camundongos machos com idade de 12 semanas, os quais, foram distribuídos em 2 grupos aleatoriamente de acordo com o tratamento a receber:

Grupo controle (C) –(n=6), administrados com 10ml/kg de salina via i.p no D1

Grupo LPS – (n=10), administrados com 0,83 mg/kg LPS via i.p no D1

Esquema experimental:

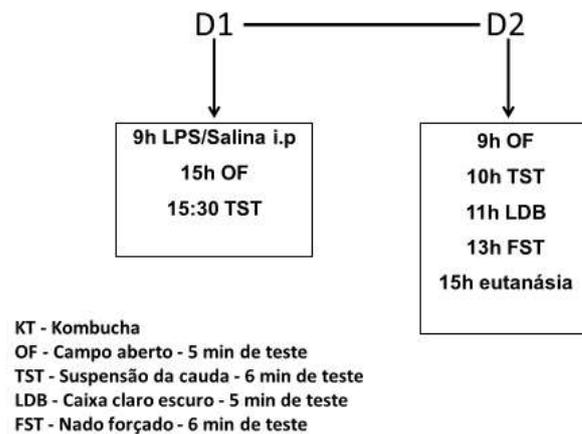


Figura 1: Delineamento experimental do Experimento I - Piloto.

8.1.1.1.1. Resultados

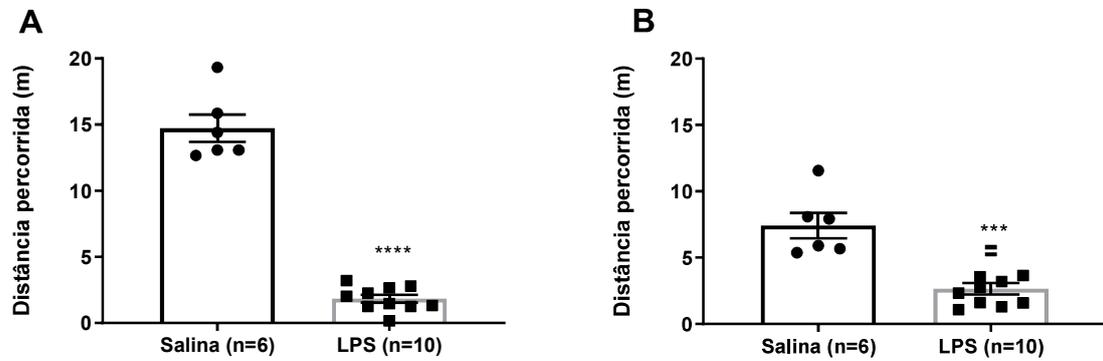


Figura 2: Efeito do LPS sobre atividade locomotora: Dados expressos como Média \pm erro padrão da média. Distância percorrida após 6h (painel A) e após 24h da administração do LPS (painel B). Teste T não pareado. *** $p=0.001$; **** $p<0.0001$.

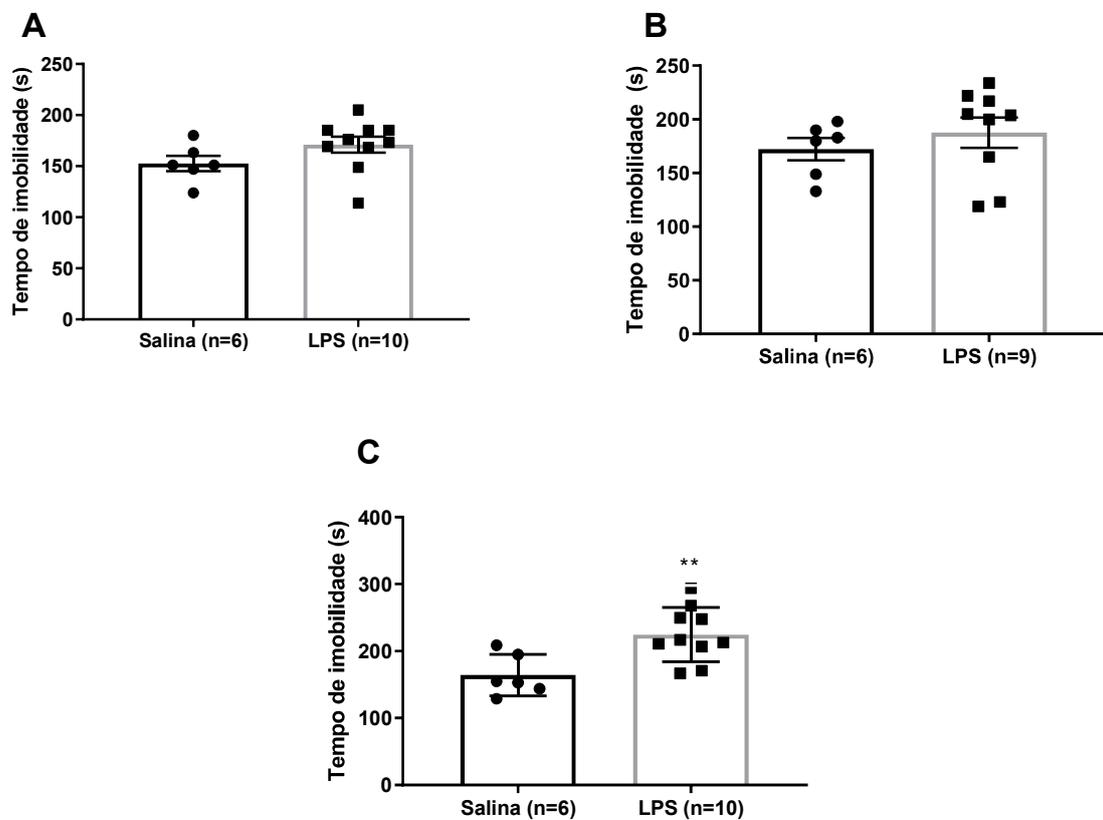


Figura 3: Efeito do LPS no comportamento tipo depressivo: Dados expressos como Média \pm erro padrão da média. Tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda após 7h (painel

A) e após 25h da administração do LPS (painel B). Tempo de imobilidade no Teste de Nado Forçado (painel C). Teste T não pareado. ** $p=0.0074$.

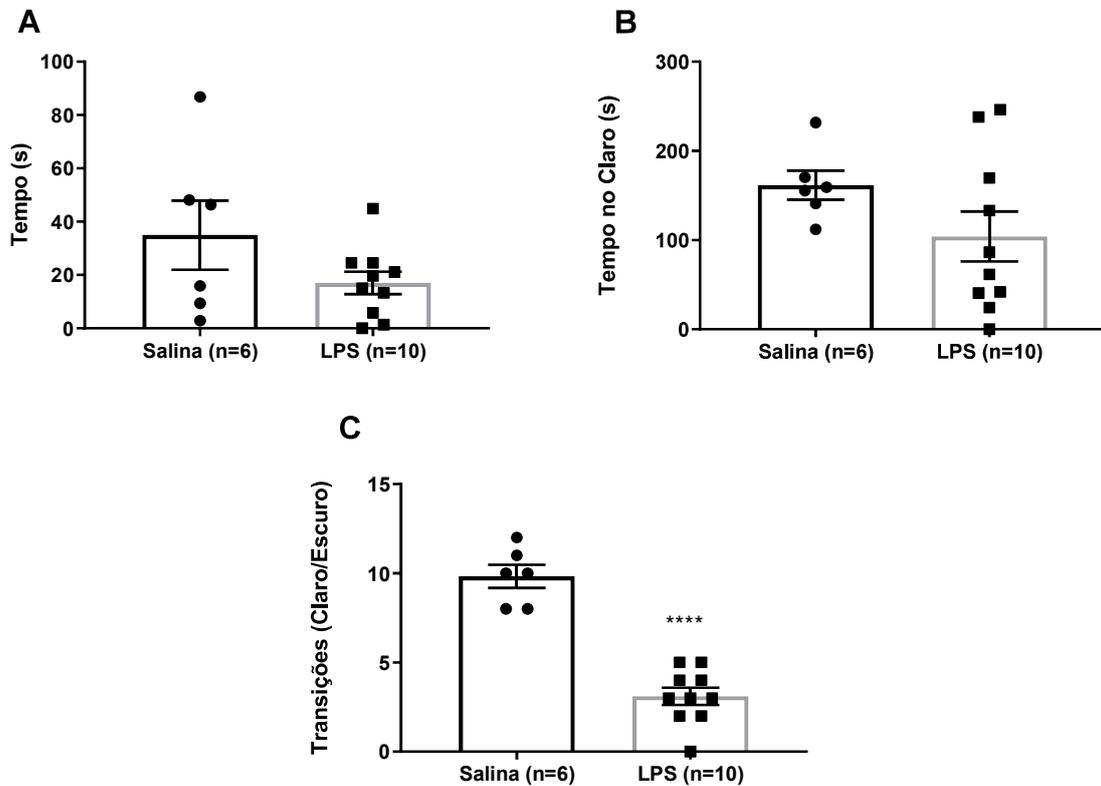


Figura 4: Efeito do LPS no comportamento tipo ansioso: Dados expressos como Média \pm erro padrão da média. Tempo de latência para entrar no compartimento claro (painel A), tempo de exploração do compartimento claro (painel B) e número de transições entre os dois compartimentos (painel C). Teste T não pareado. **** $p<0.00001$.

8.1.1.2. Experimento II

Posterior ao piloto foram realizados experimentos para avaliar se a ingestão de KT seria capaz de reverter os efeitos comportamentais provocados pelo LPS. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos de acordo com o tratamento a receber:

Grupo controle (C) - água destilada via gavagem por 23 dias + 10ml/kg salina via i.p no D22.

Grupo Kombucha (KT) - Kombucha via gavagem por 23 dias + 10ml/kg de salina via i.p no D22.

Grupo Kombucha + LPS (LPS+KT) - Kombucha via gavagem por 23 dias + 0,83 mg/kg de LPS via i.p no D22.

Grupo LPS - água destilada via gavagem por 23 dias + 0,83 mg/kg de LPS via i.p no D22.

Esquema experimental:

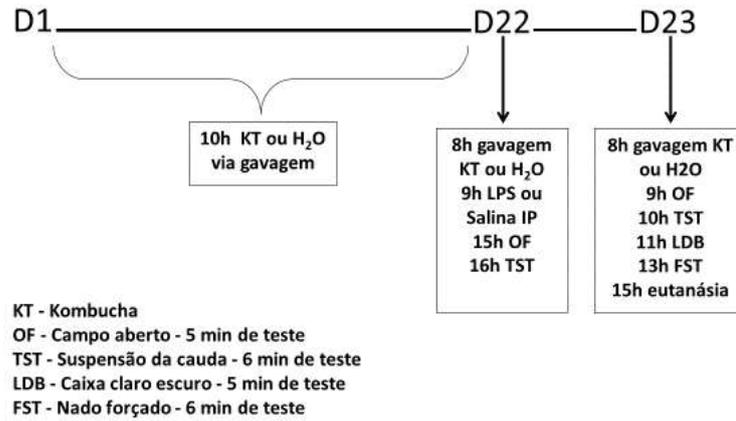


Figura 5: Delineamento experimental do Experimento II.

8.1.1.2.1. Resultados

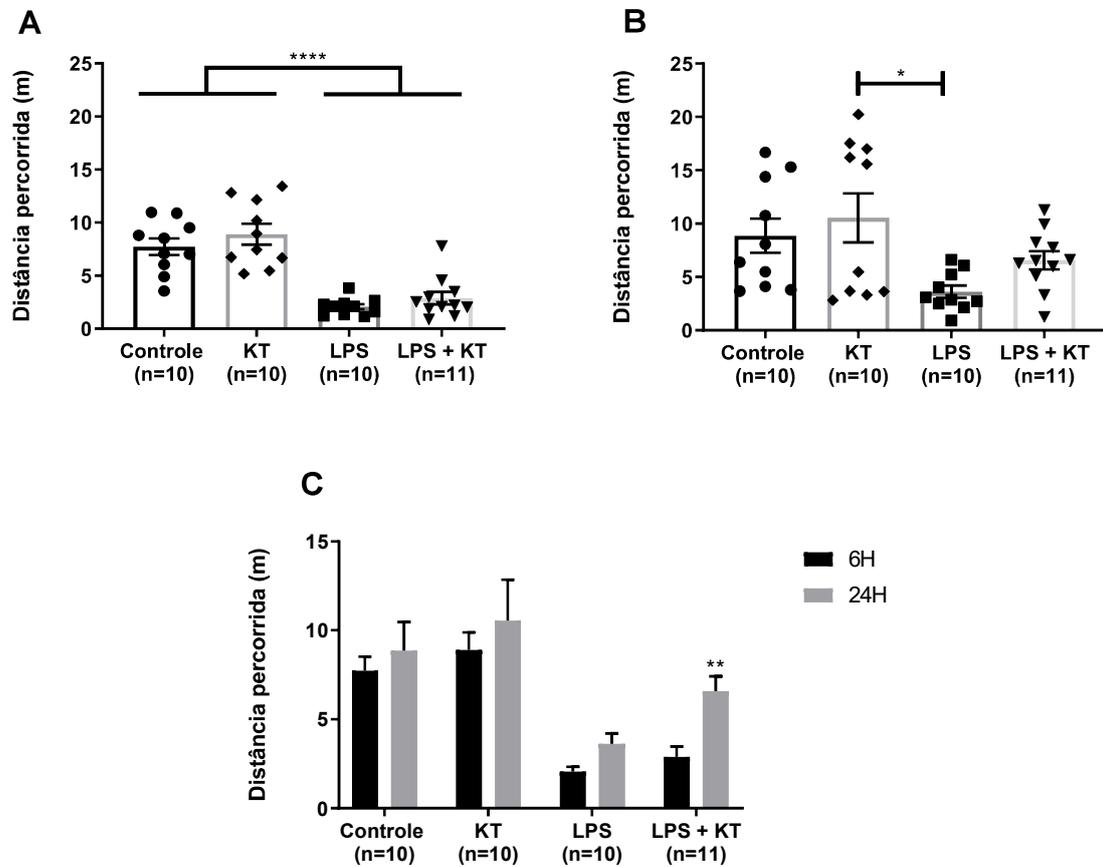


Figura 6: Efeito da KT na diminuição da atividade exploratória provocado pelo LPS. Dados expressos como Média \pm erro padrão da média. Distância percorrida após 6h (painel A) e após 24h da administração do LPS (painel B). Comparação dos tratamentos ao longo do tempo na distância percorrida (painel C). Análise de variância ANOVA de uma ou duas vias com medida repetida, seguida do teste post-hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

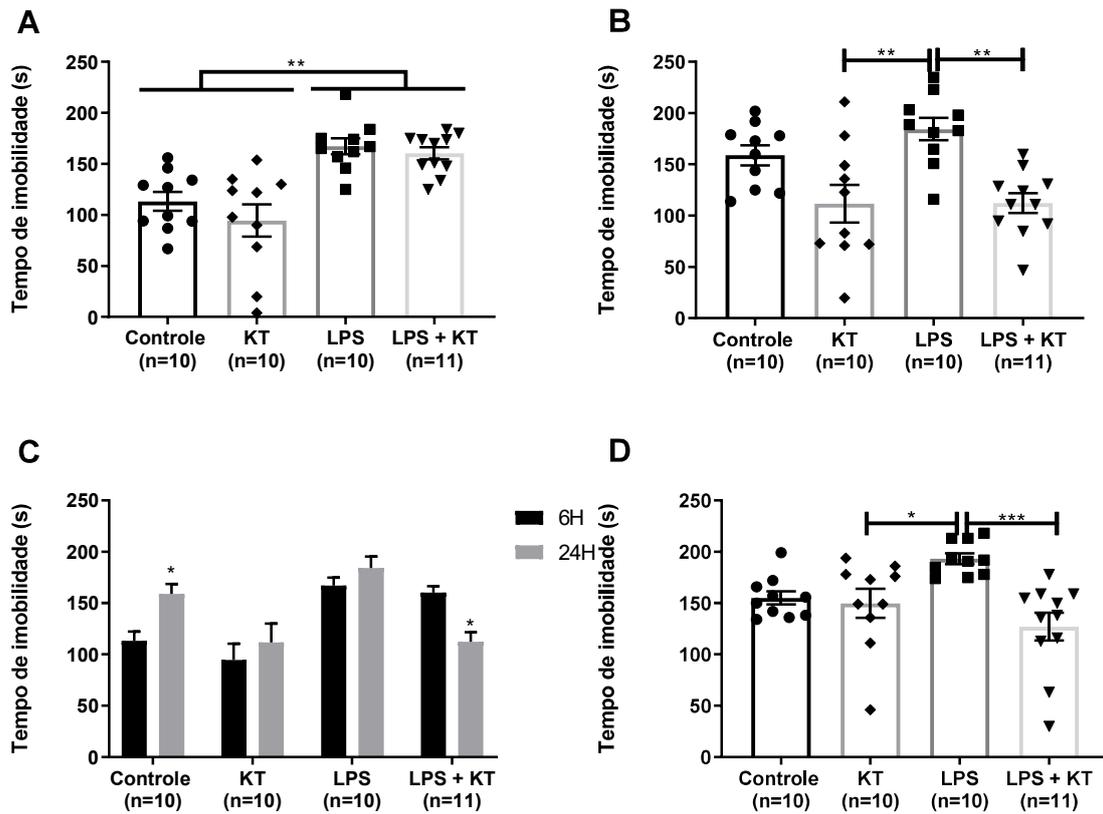


Figura 7: Efeito da KT no comportamento tipo depressivo provocado pelo LPS. Dados expressos como Média \pm erro padrão da média. Tempo de imobilidade após 7h (painel A) e após 25h da administração do LPS (painel B) e comparação do tempo de imobilidade ao longo do tempo (painel C) no teste suspensão da cauda. Tempo de imobilidade no teste de nado forçado (painel D). Análise de variância ANOVA de uma ou duas vias com medida repetida, seguida do teste post-hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

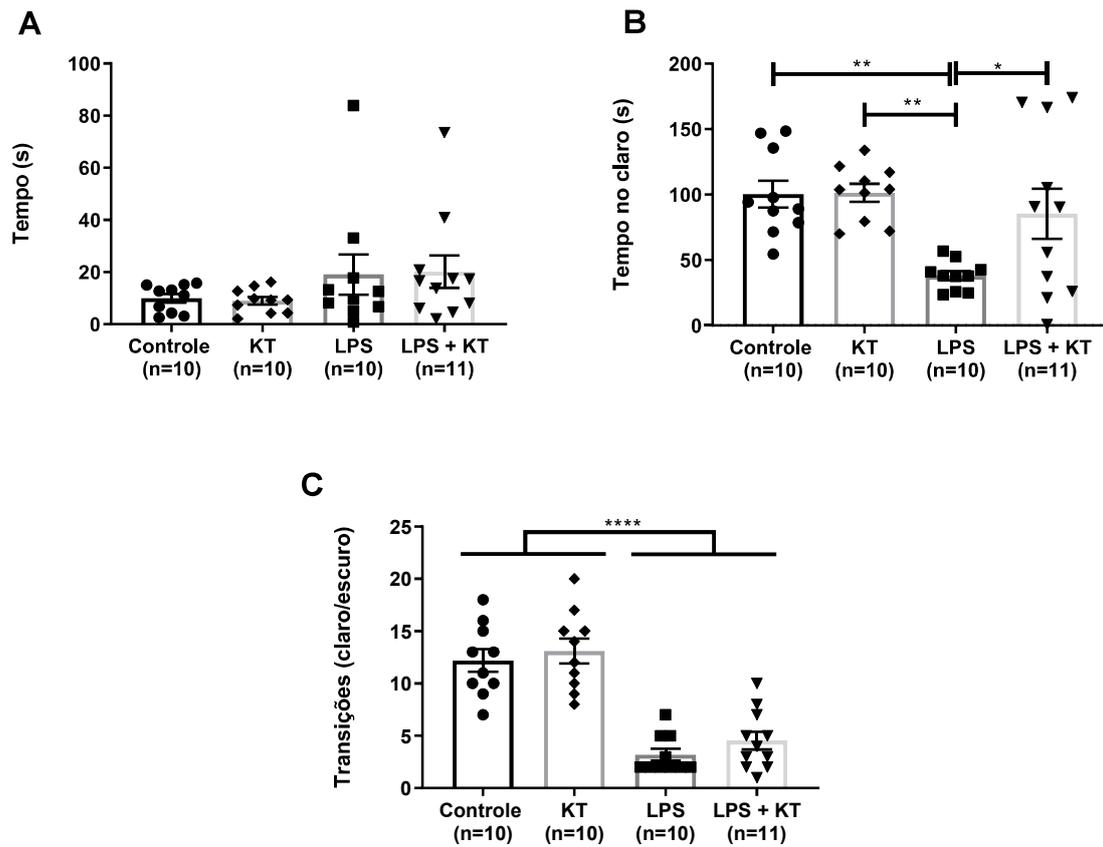


Figura 8: Efeito da KT no comportamento tipo ansioso provocado pelo LPS. Dados expressos como Média \pm erro padrão da média. Tempo de latência para a entrada no compartimento claro (painel A); tempo de exploração no compartimento claro (painel B) e número de transições entre os dois compartimentos (painel C). Análise de variância ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.