

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

ÁGATHA DJIULLYA DE MIRANDA FEIJÃO

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DA INULINA SOBRE  
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS  
RELACIONADAS A DEPRESSÃO, SOCIABILIDADE E  
MEMÓRIA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS FILHAS DE MÃES  
TRATADAS  
COM ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE *Toxoplasma gondii*  
(STAg)**

UBERLÂNDIA

2024

ÁGATHA DJULLYA DE MIRANDA

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DA INULINA SOBRE  
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS  
RELACIONADAS A DEPRESSÃO, SOCIABILIDADE E  
MEMÓRIA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS FILHAS DE MÃES  
TRATADAS  
COM ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE *Toxoplasma gondii*  
(STAg)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção de título de bacharel em biomedicina.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Vanessa Beatriz  
Monteiro Galassi Spini  
Coorientador: Frederico Rogério  
Ferreira.

UBERLÂNDIA

2024

ÁGATHA DJIULLYA DE MIRANDA FEIJÃO

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DA INULINA SOBRE  
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS  
RELACIONADAS A DEPRESSÃO, SOCIABILIDADE E  
MEMÓRIA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS FILHAS DE MÃES  
TRATADAS  
COM ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE *Toxoplasma gondii*  
(STAg)**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade Federal de  
Uberlândia como requisito parcial para  
obtenção de título de bacharel em biomedicina

Uberlândia, abril de 2024.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof<sup>a</sup> Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini (UFU)

---

Prof<sup>a</sup> Érika Renata Barbosa Neiro (UFU)

---

Dr<sup>a</sup> Simone Ramos Deconte (UFU)

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, especialmente para minha mãe que sempre fez tudo que pôde para me apoiar, assim como meu padrasto a partir do momento que entrou em minha vida.

Aos amigos e companheira que fiz durante a graduação que estiveram comigo nos momentos mais divertidos e difíceis. Espero levá-los em outras etapas da minha vida.

As minhas companheiras de pesquisa, pelo compromisso e ajuda durante o desenvolvimento dessa pesquisa.

À minha orientadora que sempre foi tão cuidadosa e atenciosa quando precisei. E meu coorientador que mesmo distante (geograficamente) sempre esteve presente com sua ajuda.

A todos que acompanhei e me incentivaram e inspiraram a seguir na carreira científica, como divulgadores científicos, professores e pesquisadores.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico que incentivou e possibilitou a realização dessa pesquisa.

À Universidade Federal de Uberlândia que me abriu portas para um novo mundo.

*“O cosmos está dentro de nós. Somos feitos de matéria estelar. Somos uma forma do cosmos conhecer a si mesmo.”*

*- Carl Sagan*

## RESUMO

Estudos vêm mostrando cada vez mais a influência da microbiota na saúde mental pelas vias neuronais, imune e endócrina, sendo que vários transtornos mentais como esquizofrenia, depressão e ansiedade estão relacionados à composição da microbiota. Uma vez que a imunização materna (IAM) é um modelo experimental cujo desafio do sistema imunológico materno induz alterações comportamentais na prole e uma vez que os prebióticos são substratos não digeríveis que promovem a simbiose por aumentarem a microbiota benéfica, com uso potencial em tratamentos este estudo objetivou investigar se a indução de IAM utilizando antígenos solúveis de *T. gondii* (STAg) em camundongos fêmeas gestantes da linhagem C57BL/6 causa alterações no comportamento da prole do tipo depressivo e comportamento social. O estudo também teve o intuito de analisar se a inulina promove uma neuroproteção na prole adulta por meio da modulação da microbiota na fase de lactação. As fêmeas grávidas receberam injeção de STAg para induzir a IAM ou PBS em E16. Os filhotes fêmeas foram tratados por gavagem de P3 a P21, sendo os grupos experimentais G1- mãe recebeu PBS; prole água; G2- mãe recebeu PBS; prole inulina; G3- mãe recebeu STAg; prole água; G4- mãe recebeu STAg; prole inulina. Na fase adulta (P60) foram feitos os testes comportamentais: “*Splash test*” que avalia o comportamento do tipo depressivo e Teste de Sociabilidade Crawley e Preferência por Novidade Social para avaliar o comportamento social. No teste de sociabilidade os animais dos grupos G1 e G2 passaram mais tempo interagindo com o animal desconhecido que com a gaiolavazia. Nos demais grupos não houve diferença significativa no tempo de interação. Quanto a preferência por novidade social apenas o grupo G2 apresentou diferença significativa, sendo que os animais passaram mais tempo interagindo com o animal familiar que com o animal desconhecido. Para o *splash test* encontramos maior número de *grooming* nos animais do G4 em relação ao G2 e do G4 em relação ao G3, demonstrando possível efeito neuroprotetor da inulina.

**Palavras-chave:** imunização materna, antígenos de *Toxoplasma gondii* solúveis, inulina, splash test, teste social de 3 câmaras, microbiota.

## ABSTRACT

Studies have increasingly shown the influence of the microbiota on mental health through neuronal, immune, and endocrine pathways, with several mental disorders such as schizophrenia, depression, and anxiety being related to the composition of the microbiota. Maternal immune activation (MI) is an experimental model in which a challenge to the maternal immune system induces behavioral changes in the offspring. Prebiotics are non-digestible substrates that promote symbiosis by increasing beneficial microbiota, with potential use in treatments. This study aimed to investigate whether the induction of MI using soluble *T. gondii* antigens (STAg) in pregnant female mice of the C57BL/6 lineage causes depressive-type changes in offspring behavior and social behavior. The study also aimed to analyze whether inulin promotes neuroprotection in adult offspring through modulation of the microbiota. Pregnant females were injected with STAg to induce MI or PBS at E16. The pups were treated by gavage from P3 to P21, with the experimental groups being G1- mother received PBS; offspring water; G2- mother received PBS; inulin offspring; G3- mother received STAg; offspring water; G4- mother received STAg; inulin offspring. In adulthood (P60), behavioral tests were carried out: “*Splash test*” which assesses depressive-type behavior, and the Crawley Sociability Test and Preference for Social Novelty to assess social behavior. In the sociability test, animals in groups G1 and G2 spent more time interacting with the unknown animal than with the empty cage. In the other groups, there was no significant difference in interaction time. Regarding the preference for social novelty, only the G2 group showed a significant difference, with the animals spending more time interacting with the familiar animal than with the unfamiliar animal. For the splash test, we found a greater number of grooming in G4 animals compared to G2 and G4 compared to G3, demonstrating a possible neuroprotective effect of inulin.

**Keywords:** maternal immunoactivation, *Toxoplasma gondii* soluble antigens, inulin, splash test, three chamber social test, microbiota.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
1.1	TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR.....	9
1.2	EIXO INTESTINO-CÉREBRO .....	10
1.3	IMUNOATIVACÃO MATERNAL.....	14
1.4	INULINA .....	15
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
2.1	OBJETIVOS GERAIS .....	16
2.1.1	<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>16</i>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>17</b>
3.1	ANIMAIS .....	17
3.2	DIETA INULINA .....	19
3.3	ANTÍGENO SOLÚVEL DE <i>T. GONDII</i> (STAG) E RESPOSTA IMUNOLÓGICA MATERNA 20	
3.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	21
3.4.1	<i>Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais: .....</i>	<i>21</i>
3.5	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	22
3.5.1	<i>Interação social (IS).....</i>	<i>22</i>
3.5.2	<i>Splash test (Spray de sacarose) .....</i>	<i>23</i>
3.6	ANÁLISE DE DADOS E ESTATÍSTICA .....	25
3.7	COMITÊ DE ÉTICA .....	25
3.8	EUTANÁSIA.....	25
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
4.1	TESTE DE INTERAÇÃO SOCIAL .....	26
4.1.1	<i>Parte I: Sociabilidade .....</i>	<i>26</i>
4.1.2	<i>Parte II: Preferência por novidade social.....</i>	<i>27</i>
4.1.3	<i>Splash test.....</i>	<i>27</i>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>32</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Transtorno Depressivo Maior

O transtorno depressivo maior (TM) é uma das principais causas de incapacidade no mundo, sendo estimado que afete aproximadamente 300 milhões de pessoas, já no Brasil, estima-se que o TM ocorra em aproximadamente 4,3% da população (BRITO et al., 2019). Além de causar incapacidade para trabalho e atividade sociais, TM também tem uma forte associação com o suicídio, que é a principal causa de morte que poderia ser prevenida, e está associado a comorbidades como doenças cardíacas coronárias, diabetes e Alzheimer (KHUSHBOO et al., 2022; MOTILLON-TOUDIC et al., 2022). Já foi demonstrado que o número de casos de depressão cresceu quase 50% de 1990 a 2017 em todas as regiões do mundo (LIU et al., 2019).

Esse transtorno mental tem como sintomas comuns a tristeza, sentimento de vazio, irritabilidade e alterações somáticas e cognitivas que, evidentemente, alteram o funcionamento normal do indivíduo, sendo o humor depressivo e a anedonia (perda de interesse e falta de prazer) essenciais para o diagnóstico, de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais V (DSM-V), da *American Psychiatric Association*. Ainda de acordo com esse manual, para ser diagnosticado com TM o indivíduo deve apresentar cinco ou mais sintomas (do total dos nove sintomas relacionados a TM) durante um período de duas semanas.

Apesar de não ser um indício essencial para o diagnóstico da depressão, o evitamento social está relacionado ao transtorno (YUAN et al., 2022). Ao evitarem situações sociais, os indivíduos podem perder a oportunidade de ter redes de apoio, de desenvolver habilidades sociais, e construir relacionamentos íntimos (FERNÁNDEZ-THEODULOZ et al., 2019). Já foi demonstrado em um estudo que pessoas depressivas se esquivam mais de situações sociais mesmo que isso vá trazer vantagem para elas (FERNÁNDEZ-THEODULOZ et al., 2019). Além disso, a esquiva social pode fazer o indivíduo ter o sentimento subjetivo de solidão, e a solidão em si já está associada à depressão (MORR et al., 2022). Há evidências que essa sensação promove a formação de vieses cognitivos negativos, cause prejuízos no processamento de memória, e altere negativamente as percepções sensoriais, assim como é um fator de risco para problemas cardíacos e aumento de mortalidade e morbidade (MORR et al., 2022).

Embora o TM não tenha uma etiologia bem determinada, sabe-se que é uma doença relacionada a fatores biopsicossociais. A hipótese monoaminérgica foi a principal explicação biológica da depressão desde meados do século 20, quando se percebeu que um fármaco anti-

hipertensivo (reserpina) tinha a possibilidade de causar TM e uma redução da quantidade de monoaminas (PEREZ-CABALLERO et al., 2018). Nessa hipótese explica-se o transtorno depressivo como um resultado de uma disponibilidade reduzida de neurotransmissores da classe das monoaminas (serotonina, noradrenalina e dopamina). Essa hipótese é apoiada pela funcionalidade dos antidepressivos que tem como mecanismo de ação a inibição (seletiva ou não) da recaptação desses neurotransmissores monoaminas, ou pela inibição da enzima monoaminoxidase (TATT LEE et al., 2022). Outros achados que também suportam a hipótese, foram estudos que examinaram a disponibilidade dos neurotransmissores e seus metabólitos in vivo e *post mortem* (MANN, MALHI, 2018). No entanto a hipótese monoaminérgica falha em explicar por que os antidepressivos demoram mais que 2 semanas para funcionarem, mesmo que o bloqueio da recaptação das monoaminas seja imediato (MANN, MALHI, 2018); e informações de testes clínicos mostram que os antidepressivos monoaminérgicos são efetivos em 60% dos casos e tem uma remissão de 40% (PEREZ-CABALLERO, 2019). Dessa forma, é notável que mais fatores devem influenciar nos casos de TM.

Uma gama de condições biológicas parece estar alterada em indivíduos com TM. Achados como elevadas concentrações de cortisol, diminuição da expressão de *BDNF* (Fator neurotrófico derivado do cérebro), atrofia no hipocampo (verificado em análise de ressonância magnética cerebral), variantes genéticas que afetam o desenvolvimento do cérebro, vias inflamatórias alteradas, microbiota alterada, entre outros (MARX et al., 2023). Vale destacar também que a situação socioeconômica (condições de baixa renda), maus tratos na infância, experiências traumáticas, falta de inclusão e apoio social se relacionam ao desenvolvimento e/ou manutenção do TM (MARX et al., 2023).

## **1.2 Eixo Intestino-Cérebro**

A microbiota humana é formada por trilhões de microrganismos, como bactérias, vírus, fungos, entre outros representando a maior densidade e abundância de microrganismos no corpo humano (BERDING et al., 2021).

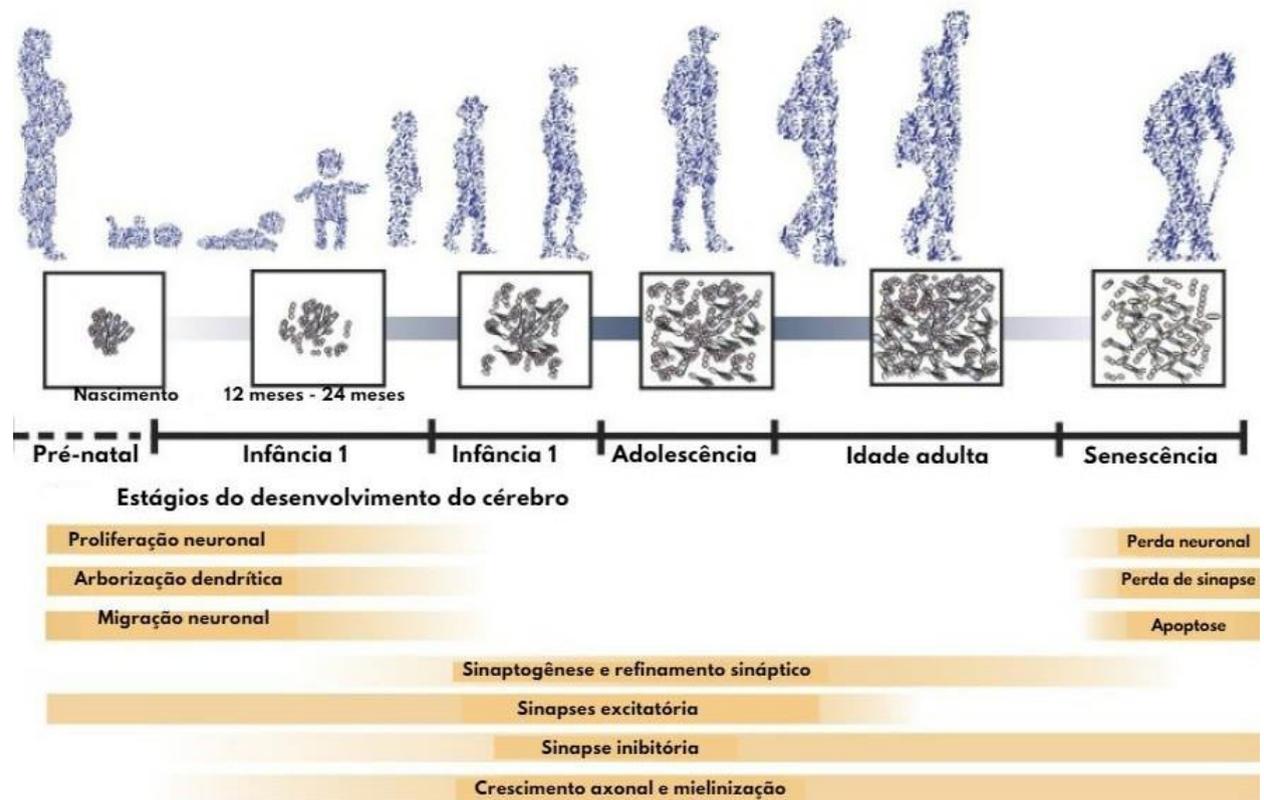
Existe um debate sobre quando a microbiota humana começa a ser formada. Enquanto existem alguns estudos que indicam que é dentro do útero (CRYAN et al. 2019) outros estudos apoiam a hipótese de que o útero é um ambiente estéril e a incapacidade de cultivar bactérias viáveis a partir dos anexos embrionários e útero apoia essa ideia anterior (REYNOLDS, BETTINI, 2023). Além disso, tem-se como evidência marcante contra a existência de microbioma

no ambiente fetal, a possibilidade de se obter animais livres de germes por meio de cesarianas e criação dos mesmos em ambiente estéril (modelo animal muito utilizado nos estudos sobre o eixo Intestino-Cérebro) (VANDENPLAS, et al. 2020).

A composição e o desenvolvimento da microbiota intestinal do bebê também podem ser influenciados por fatores pré-natais, incluindo dieta materna, obesidade, tabagismo, uso de antibióticos durante a gravidez, e práticas de alimentação (CODAGNONE, et al. 2019). Uma microbiota intestinal saudável na infância, especialmente com uma alta proporção de bifidobactérias, está ligada ao parto normal e à qualidade do leite materno (ISOLAURI, 2012).

As “janelas de desenvolvimento” são períodos em que fatores ambientais exercem uma forte influência sobre o organismo humano. Sabe-se também que a microbiota se altera ao longa da vida do indivíduo, sofrendo suas primeiras influências a depender do nascimento (se parto normal ou cesárea), tipo de alimentação (amamentação ou consumo de fórmulas) (CRYAN et al. 2019). Outras fases em que a microbiota pode se alterar de forma importante, impactando na saúde do indivíduo, compreende a adolescência e senescência (DOMINGUEZ-BELLO et al. 2018).

É interessante destacar que os períodos sensíveis ou janelas de desenvolvimento da microbiota, coincidem com alterações importantes em outros sistemas do corpo humano, como sistema imunológico inato, eixo hipotálamo-hipófise, e principalmente o desenvolvimento do sistema nervoso (Figura 1) (CRYAN et al. 2019). A microbiota intestinal tem um crescimento gradual, tende a estabilizar e por fim declina lentamente (LIANG et al. 2018). A composição filogenética infantil aumenta de forma significativa no período pós-natal e evolui para uma configuração semelhante a adulta quando atinge 3 anos de idade (LIANG et al. 2018).



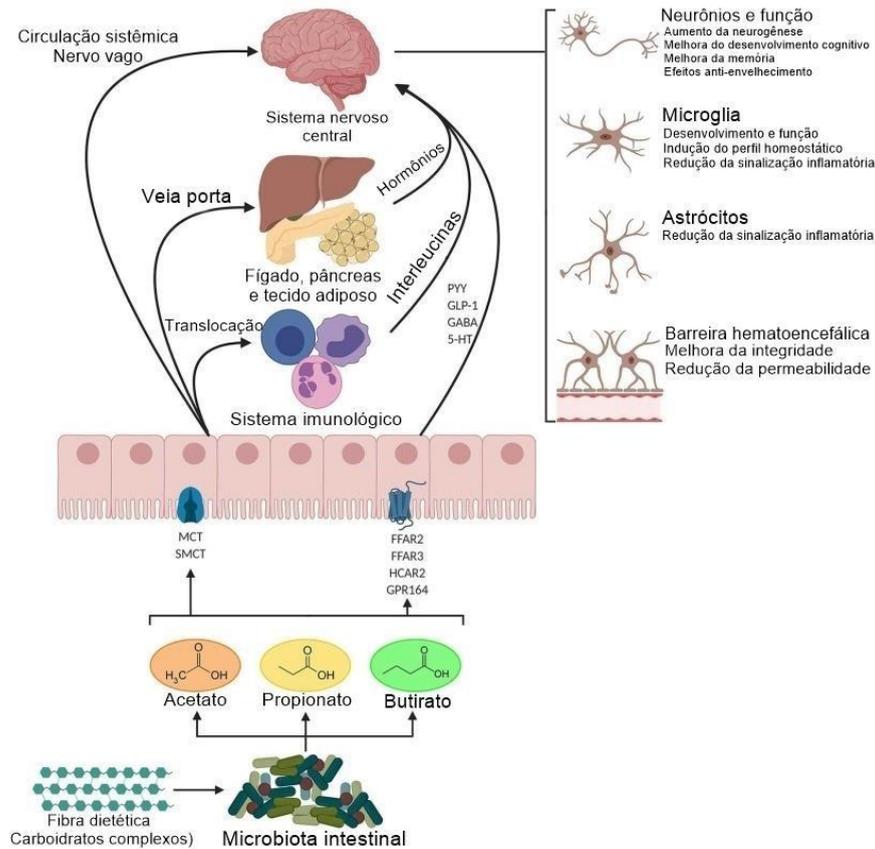
**Figura 1:** Linha do tempo de vida de um humano relacionado as fases de desenvolvimento do sistema nervoso com a idade e mudanças da diversidade e quantidade da microbiota intestinal. Adaptado de Cryan e colaboradores (2019).

Modelos experimentais com animais livres de germes (modelo em que os animais são criados em ambiente estéril e por conta disso não possuem microbiota intestinal) demonstraram a importância da microbiota precoce ao encontrarem que esses animais apresentam barreira hematoencefálica mais permeável por terem menos proteínas de junção (BRANISTE, et al. 2014), *BDNF* diminuído (SUDO, et al. 2004), diminuição da neurogênese (MCVEY, et al. 2016) expressão baixa de proteínas de mielinização (LU, et al. 2012); mais comportamentos do tipo ansiosos (HUO, et al. 2017), e do tipo depressivos (CAMPOS, et al. 2016).

Estudos vêm mostrando cada vez mais que a comunicação bidirecional entre o Intestino-Cérebro que é fortemente influenciada pela microbiota intestinal. Os mecanismos envolvidos nessa comunicação envolvem as vias hormonais, metabólicas, imunes e neuronais (Figura 2) (MORAIS et al. 2021).

Metabólitos microbianos como ácidos biliares secundários, derivados de indol e ácidos graxos de cadeia curta (*SCFAs*) podem modular a secreção de GLP1 (peptídeo 1 semelhante a glucagon), peptídeo YY, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) e serotonina, através da sinalização em

células enteroendócrinas (SILVA et al. 2020). Essa comunicação entre o microbioma intestinal e o trato gastrointestinal desempenha um papel significativo na regulação do apetite, metabolismo e função gastrointestinal (MORAIS et al. 2021).



**Figura 2:** Esquema geral das vias de como a microbiota influencia na comunicação do eixo intestino-cérebro, assim como efeitos dos metabólitos bacterianos (Principalmente os *SCFAs*: acetato, propionato e butirato) na neuroinflamação e função dos neurônios. Receptores de células do cólon - *MCT*: Transportadores de monocarboxilado dependentes de H<sup>+</sup>; *SMCT*: Transportadores de monocarboxilato dependentes de sódio; *FFAR2*: Receptores de ácidos graxos livres 2; *FFAR3*: Receptores de ácidos graxos livres 3; *HCAR2*: Receptor de ácido hidrocarboxílico; *GPR164*: Receptor acoplado G. Adaptado de Silva e colaboradores (2020).

É sabido que as células enterocromafins são responsáveis pela produção da maior parte da serotonina, sendo que cerca de 95% desse neurotransmissor está armazenado nessas células (JONES et al. 2020). Uma pesquisa de análise do perfil de metabólitos plasmáticos com camundongos livres de germes no intestino mostrou que os níveis plasmáticos de serotonina foram duas vezes menores que em camundongos colonizados normalmente com microorganismos

(MARTIN et al. 2018), demonstrando-se dessa forma a forte influência da microbiota na regulação da atividade das células enterocromafins.

O principal elemento da comunicação da via neuronal é o nervo vago formado por fibras nervosas sensorial/aférentes e motoras/eférentes. Esse nervo se estende do tronco cerebral até o abdômen para inervar o intestino e o sistema nervoso entérico (WANG et al. 2023). Produtos microbianos, hormônios influenciados pela microbiota e mediadores imunológicos podem interagir com aferentes vagais, afetando como consequência áreas do cérebro relacionadas à cognição, humor, medo/ansiedade, comportamento alimentar e somatossensação (AGIRMAN, HSIO, 2021). Pesquisas relacionando o nervo vago à depressão são de longa data, sendo que desde 2005 a estimulação do nervo vago é aprovada para o tratamento de depressão resistente pela FDA (Food and Drug Administration), que é a Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (YAO et al. 2023).

A microbiota intestinal tem uma influência clara também no sistema imunológico. Pesquisas com camundongos sem germes demonstraram uma diminuição de células como linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e das células do tecido linfóide intestinal, lâmina própria e placa de Peyer. Esse déficit foi superado após promoverem a recolonização desses animais com *Bacteroides fragillis* (ASADI et al. 2022). Também já foi mostrado que essas bactérias podem regular atividade de respostas de células B, células T, células T auxiliares e células T reguladoras convencionais (ANSALDO et al. 2021).

A integridade da barreira intestinal é de suma importância para garantir a proteção intestinal contra patógenos e para evitar que padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) de bactérias, como lipopolissacarídeos (LPS), sejam liberados para circulação, podendo atingir o cérebro (MARGOLIS et al. 2021). Neste contexto, os metabólitos microbianos, são de grande importância, uma vez que exercem influência na manutenção da integridade da barreira intestinal (SILVA et al. 2020).

### **1.3 Imunoativação Maternal**

Estudos mostram que a ativação do sistema imunológico materno durante a gestação, referido como “imunoativação maternal (IAM)” aumenta o risco de desenvolvimento de transtornos psiquiátricos nos filhos na fase adulta por diferentes mecanismos, como aumento das

citocinas pró-inflamatórias (BOULANGER-BERTOLUS, 2018). Essa resposta imunológica materna pode ser ativada por algum desafio imunogênico que ocorra durante a gestação como, por exemplo, a exposição ao LPS, Poli I:C e STAg (antígenos solúveis de *Toxoplasma gondii*), estresses ambientais, entre outros (CONWAY; BROWN, 2019). Assim, a IAM é um modelo animal experimental útil para induzir comportamentos relacionados a distúrbios neurofisiológicos e neuropsiquiátricos na prole adulta. Spini e colaboradores (2020) desafiaram fêmeas prenhas de BalbC com STAg aos 6 e 16 dias de gestação e encontraram comportamento do tipo ansioso e depressivo na prole adulta, quando avaliados pelos testes de labirinto em cruz elevada e nado forçado. Saunders e colaboradores (2020) demonstraram que animais provenientes de fêmeas desafiadas durante a gestação com H1N1 apresentaram modificações na composição da microbiota, e essas modificações estavam diretamente relacionadas a comportamentos do tipo esquizofrênico. Assim, acredita-se que um dos mecanismos envolvidos na modulação da resposta imunológica materna e que resulta em desenvolvimento de transtornos psiquiátricos na prole esteja relacionado à microbiota intestinal (LI, et al. 2021).

#### 1.4 Inulina

O microbioma intestinal pode ser modificado por meio de intervenções prebióticas, probióticas e dietéticas (DALILE et al., 2019). Diferente dos probióticos que são microrganismos vivos que podem impactar positivamente a saúde do hospedeiro (YADAV et al. 2022), os prebióticos são substratos não digeríveis que melhoram a quantidade e diversidade da microbiota intestinal saudável, com indícios de efeitos positivos sobre cognição e humor (ANSARI et al., 2020).

A inulina é um prebiótico oligossacarídeo que é fermentado facilmente por bactérias intestinais, tendo como produto grandes quantidades de *SCFAs* (ácidos graxos de cadeia curta): acetato, propionato e butirato (BASTARD et al., 2020). *SCFA* é o principal metabólito fermentado anaeróbico da microbiota intestinal no eixo microbiota-intestino-cérebro (GUO et al., 2022), além de estar envolvido na neuroproteção de várias doenças neurológicas, incluindo doenças neurodegenerativas, doenças vasculares cerebrais, epilepsia, doenças inflamatórias neuroimunes e transtornos de humor (GUO et al., 2022).

Está presente em vegetais e frutas como alho, cebola e banana, assim como também é adicionado a fórmulas para crianças (FAN; CAO; ZHANG, 2016).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

O objetivo deste trabalho é investigar um possível efeito neuroprotetor da inulina administrada durante a fase de lactação em camundongos (fêmeas) filhos de mães desafiadas com STAg no período gestacional, sobre comportamento social e do tipo depressivo.

#### **2.1.1 Objetivos específicos**

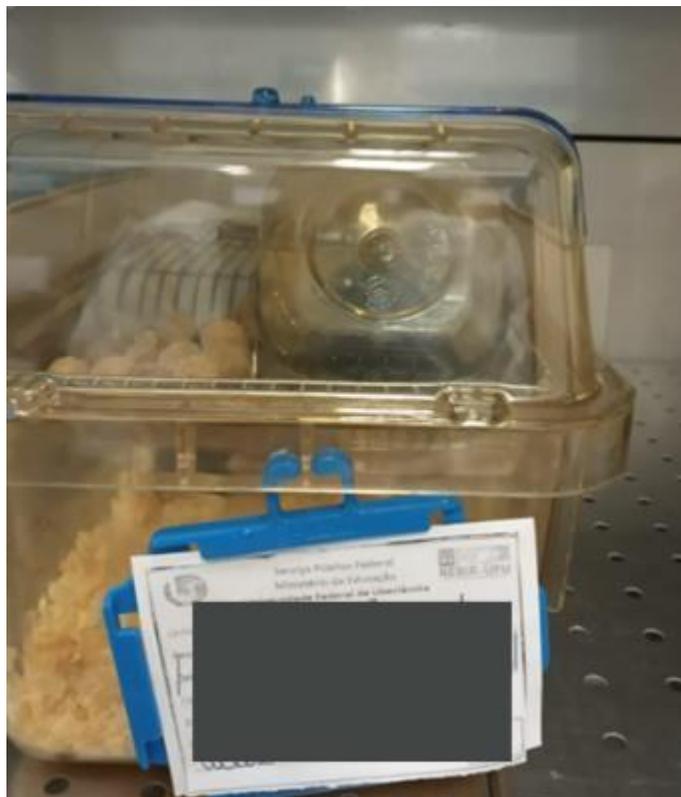
Investigar se a indução de Imunoativação maternal por STAg na idade gestacional E16 provoca alterações comportamentais na prole fêmea em idade adulta em relação a comportamentos do tipo depressivos e de sociabilidade, por meio de testes comportamentais (Splash Test e Teste de Interação Social);

Avaliar, por meio dos testes, Splash Test e Teste de Interação Social, se a administração de inulina aos filhotes fêmeas lactentes irá prevenir os danos causados pelo uso de STAg durante a gestação, protegendo contra os comportamentos do tipo depressivos, de sociabilidade e memória social.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Animais

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram fornecidos pela REBIR-UFU (Rede de Biotérios da Universidade Federal de Uberlândia) e acondicionados no mesmo local, mantendo-se as condições padrões de luz (12h:12h, claro: escuro) e alimentação e água (*ad libitum*). A ração é chamada de “BioBase BioTec Alimento Equilibrado” para ratos e camundongos. A indústria fornecedora é a Base Química Produtos Químicos LTDA, de Águas Frias-SC, Brasil. A água disponibilizada em bebedouros aos animais foi água potável e filtrada. As gaiolas tiveram bebedouros individuais (Figura 3), sendo trocados semanalmente.



**Figura 3:** Gaiola individualiza. Autores 2023.

Para a obtenção dos filhotes, os progenitores foram colocados para acasalar no próprio REBIR em gaiolas na proporção de 2 fêmeas para 1 macho, sendo as fêmeas avaliadas diariamente para observação da rolha vaginal (tampão vaginal formado pela mistura de secreção vaginal com sêmen) (Figura 4).



**Figura 4:** Imagem de fêmea que apresentou rolha vaginal. Autores 2023.

Em relação às mães, após as injeções elas retornaram às suas caixas de criação e foram monitoradas diariamente, até o nascimento e o desmame dos filhotes (aproximadamente 21 dias). Os animais foram observados quanto ao seu estado geral de saúde, analisando-se o padrão de atividade normal para roedores (como “*grooming*” e “*licking*”, referentes aos cuidados do animal com o próprio pelo); perda de peso e consumo de alimentos.

Após o desmame, todos os filhotes foram em machos e fêmeas e colocados em gaiolas com no máximo 5 animais até atingirem a idade adulta de 60 dias após o nascimento (P60), quando então foram submetidos aos testes comportamentais.

O REBIR-UFU conta com sistema de exaustão (Figura 5) que controla o fluxo de ar em caixas isoladas.



**Figura 5:** Estante com sistema de exaustão na Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia. Autores 2023.

### 3.2 Dieta inulina

Os animais (filhotes fêmeas) foram tratados com 50 $\mu$ L inulina (EVOVA) a 10% (tendo como veículo água destilada) do 3<sup>o</sup> ao 21<sup>o</sup> dia pós-nascimento via gavagem com pipeta (Figura 6) , uma vez que os animais começaram a ser tratados recém-nascidos, se tornando assim inviável o uso de agulha de gavagem.



**Figura 6:** Imagem da gavagem utilizando pipeta para filhote com aproximadamente 2 semanas de vida.

### **3.3 Antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg) e resposta imunológica materna**

Para o desafio imunogênico materno usamos Antígeno Solúvel de *T. gondii* (STAg) a 25 $\mu$ g/100 $\mu$ L em um volume de 100  $\mu$ L por animal via injeção intraperitoneal no 16<sup>o</sup> dia de gestação (E16), período esse relacionado ao desenvolvimento neural dos animais e que já se mostrou adequado para a indução de sintomas relacionados a transtornos do tipo depressivos (SPINI et. al 2020). O veículo da inulina foi PBS autoclavado.



### 3.5 Testes comportamentais

#### 3.5.1 Interação social (IS)

O teste de paradigma de três câmaras, conhecido como Teste de Sociabilidade Crawley e Teste de Preferência por Novidade Social, tem sido empregado para estudar interação social e memória social e baseia-se no princípio de livre escolha do rato ou camundongo experimental em gastar tempo em um dos três compartimentos do aparato por 10 min. O aparato, uma caixa de vidro (60x45x25cm), é dividido em três compartimentos, CA, CB e CC. O compartimento do meio (CB) sempre fica vazio (sem gaiolas), enquanto os outros possuem gaiolas. O primeiro teste (teste 1) é o de sociabilidade, o qual a gaiola do CA tem um animal dentro (animal desconhecido ou não familiar), enquanto a do CC fica vazia. O segundo teste (teste 2) é o de preferência por novidade social, o qual as duas gaiolas têm animais dentro, no entanto, o animal utilizado no primeiro teste vai para o compartimento CC (sendo considerado animal familiar agora) e o animal novo (desconhecido ou não familiar) é colocado no compartimento CA (Figura 9).

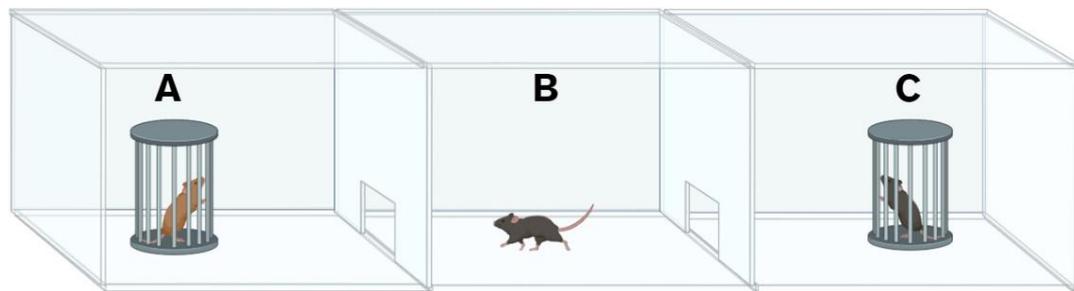
Cada animal foi submetido a uma sessão de habituação na arena, com os compartimentos abertos e gaiolas vazias, podendo o animal explorar livremente o aparato por 5 minutos. 24 horas após a sessão de habituação foi realizado o Teste 1 (T1), o Teste de Sociabilidade Crawley, no qual um animal desconhecido 1 foi colocado na gaiola de metal localizada em CA, o animal experimental foi colocado no compartimento central CB e no compartimento CC permaneceu a gaiola vazia; a seguir todas as divisórias foram removidas e o animal experimental pôde explorar o aparato livremente entre os compartimentos.

Após o término de T1, os animais foram removidos do aparato e o mesmo limpo com álcool 20%, a seguir teve início o Teste 2, o Teste de Preferência por Novidade Social, no qual o animal desconhecido 1 utilizado no teste anterior em CA foi colocado na gaiola em CC, sendo utilizado agora como animal familiar. Em CA foi posicionado um novo animal desconhecido (Animal controle 2), que foi nosso animal não familiar, e como aconteceu no Teste 1 as divisórias foram removidas e o animal experimental pôde explorar o aparato, agora com um animal familiar e um não familiar.

Todo o experimento foi documentado por meio de vídeo, com a câmera posicionada acima do aparato.

O comportamento social do animal experimental foi avaliado a partir da análise do vídeo, considerando: duração total de contatos diretos (em segundos) entre o animal experimental e a

gaiola de metal vazia; a duração de contato (em segundos) entre o animal experimental e os animais desconhecidos 1 e 2 em suas respectivas gaiolas; e o total de tempo gasto pelo animal experimental em cada compartimento do aparato (considerado quando a cabeça e 4 patas estiverem dentro do compartimento).



**Figura 8:** Aparato utilizado para realizar os testes de comportamento social. Bionrender, 2024.



**Figura 9:** Ilustração geral do teste de interação social.

### 3.5.2 Splash test (Spray de sacarose)

O teste Spray de sacarose avalia a anedonia (perda de capacidade de sentir prazer e falta de motivação) e falta de autocuidado em roedores. Por meio da análise do comportamento de “*grooming*” dos animais, é medido o estado hedônico deles. Neste teste os animais foram alocados individualmente em uma caixa de acrílico (42 x 24 x 12 cm). Posteriormente, uma

solução de sacarose a 10% (Figura 11) foi esguichada nos pelos dorsais do camundongo (Figura 10) e por causa da viscosidade da solução a tendência natural do animal é começar a limpar a região. Após a aplicação da solução, a latência para ocorrer o primeiro comportamento de limpeza e a quantidade de *groomings* realizados foram gravados por 5 minutos, a fim de estabelecer parâmetros de autocuidado e comportamento motivacional, sintomas que quando em déficit estão associados a transtornos depressivos. Por fim, após cada animal ter sido testado, a caixa foi higienizada com uma solução de álcool 20%. O protocolo para esse teste foi baseado em ROSA et al (2014).



**Figura 10:** Animal durante a realização do *Splash Test*.



**Figura 11:** Aparelho borrifador utilizado no *Splash Test*.

### 3.6 Análise de dados e estatística

Os resultados dos testes comportamentais de comportamento social foram analisados por ANOVA bifatorial  $p < 0,05$ . Alterações significativas do ANOVA bifatorial foram seguidas pelo post hoc de Bonferroni para comparação entre os grupos de interesse. Enquanto que os testes de *Splash Test* foram analisados por ANOVA *one-way*  $p < 0,05$ .

### 3.7 Comitê de ética

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, no dia 21 de outubro 2022, tendo como número de protocolo CEUA: 23117.037394/2022-63.

### 3.8 Eutanásia

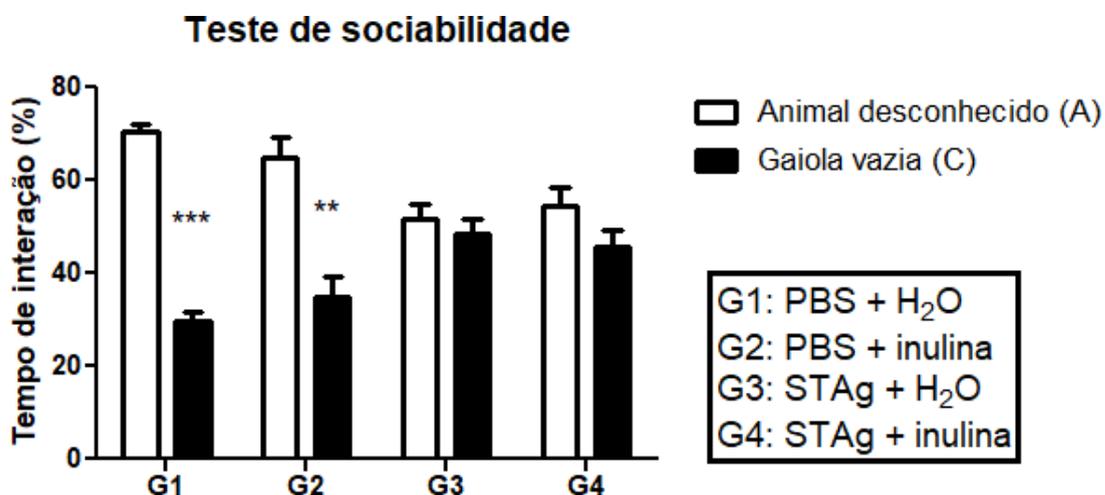
A indução da eutanásia ocorreu por injeção via intraperitoneal de solução anestésica contendo cetamina 80mg/Kg e xilazina 10 mg/Kg, seguido de deslocamento cervical. As progenitoras (tanto as que receberam STAg quanto as que receberam PBS) foram eutanasiadas após o desmame da prole (21 dias de vida para prevenir sofrimento desnecessário). Os machos utilizados para o acasalamento foram eutanasiados após a detecção da rolha vaginal e confirmação da gravidez das fêmeas. Já a prole foi eutanasiada após os testes comportamentais. Fêmeas utilizadas como animal desconhecido no teste de IS foram eutanasiadas ao final de todos testes. As carcaças foram acondicionadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  no REBIR-UFU, até o momento do descarte definitivo.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Teste de Interação Social

#### 4.1.1 Parte I: Sociabilidade

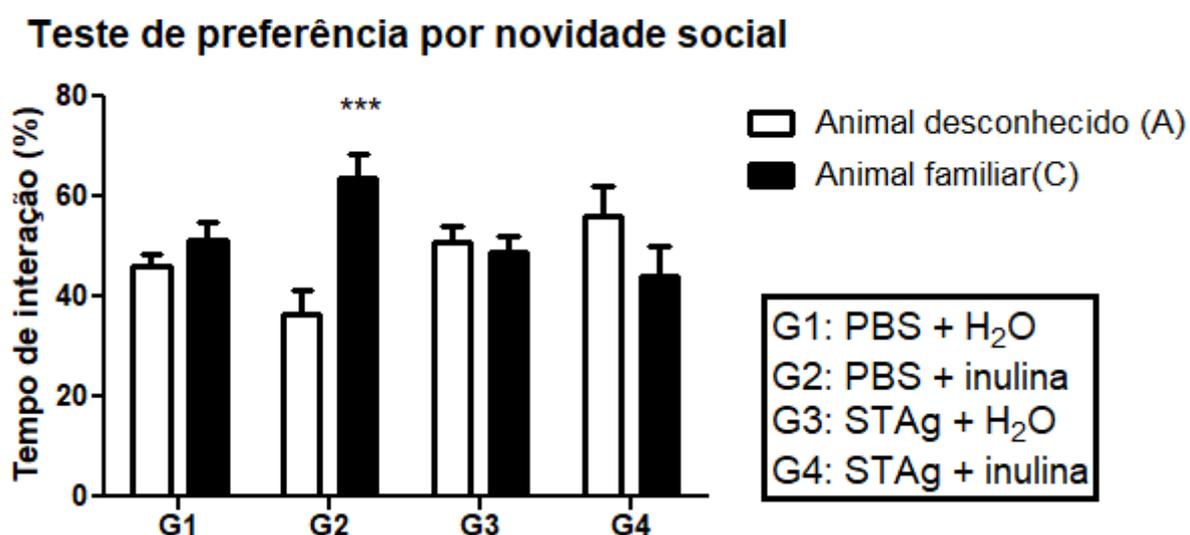
Os resultados demonstrados na (Figura 12) se referem ao Teste 1 em relação ao tempo de interação com o animal desconhecido e a gaiola vazia. Observamos diferença significativa no tempo de interação nos grupos G1 ( $65 \pm 3,13$ ) e G2 ( $50,88 \pm 7,12$ ). Nos demais grupos a diferença não foi significativa  $P > 0,05$ .



**Figura 12:** Tempo de interação em porcentagem dos grupos experimentais na primeira parte do Teste de Interação Social. \* -  $P < 0,05$  entre o tempo de interação com o animal desconhecido e a gaiola vazia. Os resultados foram expressos na forma de média±EPM.

#### 4.1.2 Parte II: Preferência por novidade social

Os resultados demonstrados na Figura 13 se referem ao teste de preferência pela novidade social. O grupo G2 apresentou diferença significativa quando se analisou o tempo de interação com o animal familiar ( $59,12 \pm 3,52$ ) em comparação com o tempo de interação com o animal desconhecido ( $35,12 \pm 5,85$ ). Os outros grupos apresentaram tempo de interação semelhantes e não foi possível obter diferenças significativas. Nos outros grupos não houve diferença significativa.



**Figura 13:** Tempo de interação em porcentagem dos quatro grupos experimentais na segunda parte do Teste de Interação Social. \* - Diferença significativa menor ou igual a 0,05 entre o tempo de interação com o animal desconhecido com o animal familiar.

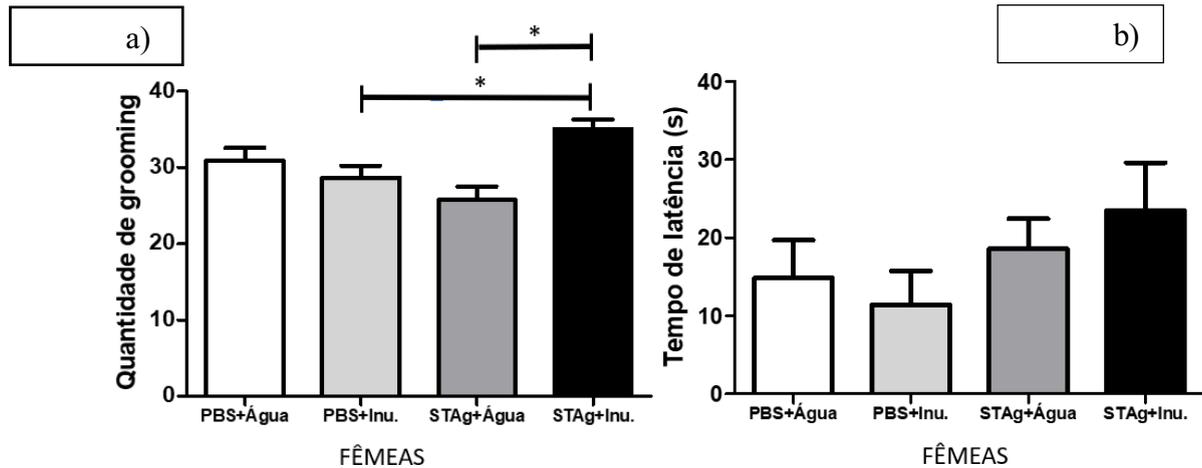
#### 4.1.3 *Splash test*

O *splash test* tem a função de analisar o comportamento motivacional dos animais, assim como o autocuidado por meio da quantidade de *groomings* e tempo de latência para a realização do primeiro *grooming*.

A análise apresentada demonstra que o grupo tratado com inulina e proveniente de fêmeas desafiadas com STAg ( $35 \pm 1,2$ ;  $p < 0,05$ ) apresentou maior quantidade de *groomings* (Figura 14(a)) que os animais tratados com água e provenientes de fêmeas desafiadas com STAg ( $28,4 \pm 2$ ;  $p < 0,05$ ). Assim como também, foi encontrado diferença significativa entre o grupo tratado com

inulina e proveniente de fêmeas desafiadas com STAg ( $35 \pm 1,2$ ;  $p < 0,05$ ) e o grupo de animais tratados com inulina provenientes de fêmeas que receberam PBS em E16 ( $28,6 \pm 1,5$ ;  $p < 0,05$ ).

Não foi encontrada diferença estatística relevante entre os grupos quando analisados tempo de latência como demonstrado no gráfico da (Figura14 (b)).



**Figura 14:** Resultados do tempo de latência e quantidade de *groomings* após ter borrifado a solução de sacarose a 10% no camundongos. Fig. 13-a: Tempo de latência (s); Fig. 13-b Quantidade de *groomings*. \* -Diferença significativa. No eixo X está indicado o grupo de análise (G1: PBS+Água – animais provenientes de fêmeas que foi aplicado PBS em E16 e a prole foi tratada com água de P3-P21; G2: PBS+Inulina– animais provenientes de fêmeas que foi aplicado PBS em E16 e a prole foi tratada com Inulina de P3-P21; G3: STAg+Água – animais provenientes de fêmeas que foi aplicado STAg em E16 e a prole foi tratada com água de P3-P21; G4: STAg+Inulina – animais provenientes de fêmeas que foi aplicado STAg em E16 e a prole foi tratada com inulina de P3-P21).

\*\* $p < 0.05$ .

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo analisamos os efeitos do insulto imunogênico da mãe grávida (injeção de STAg aplicada no período E16) na prole adulta, em camundongos C57BL/6, assim como os efeitos neuroprotetores da inulina por meio da análise de testes que medem comportamentos dos tipos depressivos (*Splash test*) e comportamento social que também é afetado por TM (BADDELEY, PENNEBAKER, BEEVERS, 2013).

Quanto ao comportamento social, espera-se que um animal saudável tenha preferência por permanecer mais tempo no compartimento que possui um animal co-específico, em relação ao compartimento que possui a gaiola vazia (teste 1). Também se espera que ao ser colocado para interagir com o mesmo animal da etapa anterior ou com um animal novo, ele prefira interagir com o animal novo, que representa uma novidade social (teste 2). Nos nossos experimentos os animais do grupo 1 demonstraram comportamento normal, ao buscarem interagir mais com o animal desconhecido que com a gaiola vazia, o mesmo ocorrendo para os animais do grupo 2, que foram tratados com inulina. Podemos inferir, assim, que o teste funcionou e que a inulina, sozinha, teve um efeito benéfico. Nos demais grupos, o STAg parece ter interferido no comportamento, uma vez que os animais não diferenciaram gaiola com animal desconhecido e gaiola vazia, interagindo da mesma forma. Entretanto, aqui a inulina não conseguiu reverter os danos comportamentais. Amadiou e colaboradores (2021) relataram após estudos clínicos que a suplementação de inulina em pacientes com adicção em álcool melhorou a sociabilidade e aumentou os níveis de *BDNF*. Quanto ao teste 2, apenas o grupo G2 (PBS + inulina) apresentou diferença significativa, com maior tempo de interação com o animal familiar em relação ao animal desconhecido, diferente do esperado.

Em relação ao *splash test* o aumento na quantidade de *groomings* no grupo G4 em relação ao grupo G3 e de G4 em relação a G2 são indicativos de que a inulina exerceu um efeito neuroprotetor na prole, aparentemente, mediado pela melhora na microbiota intestinal. De acordo com Guo e colaboradores (2021) a inulina pode melhorar os sintomas relacionados à esquizofrenia, modulando a microbiota intestinal e reduzindo a neuroinflamação.

Embora o tempo de latência não tenha expressado diferença significativa entre os grupos, os resultados significativos da quantidade de *groomings* aumentada em animais tratados com inulina são promissores. Não foi possível encontrar na literatura científica atual outros estudos

que tiveram realização do *Splash Test* para analisar os efeitos antidepressivos da inulina, a fim de podermos comparar os resultados.

Chen e colaboradores (2023) demonstraram por meio de estudos com camundongos que o horário de administração da inulina e os padrões dietéticos podem modificar seus efeitos sobre ansiedade e depressão, com a administração pela manhã mostrando melhores resultados. Nos nossos experimentos a inulina foi administrada preferencialmente no período da tarde, entretanto houve dias em que a administração ocorreu no período da manhã.

Mas já foi constatado em outros modelos animais com camundongos que a inulina pode melhorar o metabolismo e alterar a microbiota intestinal, potencialmente diminuindo o risco de doença de Alzheimer (HOFFMAN, et al. 2019) e que é possível que o prebiótico potencialize o processo de recuperação de lesões traumáticas leves e mitigue a disbiose intestinal associada a essas lesões (YANCKELLO, et al. 2022). Esses estudos sugerem coletivamente que a inulina pode ter um impacto positivo em distúrbios cerebrais.

No geral, destacamos que alguns outros fatores podem ter afetado os resultados dos testes comportamentais. No decorrer dos experimentos teve um período em que houve reforma no biotério, e isso pode ter gerado estresse nas fêmeas grávidas, ao mudarem elas de local e terem ficado um período em um espaço junto com ratos. Ratos são predadores naturais de camundongos, e o fato delas terem sentido o cheiro deles pode ter causado muito estresse durante a gravidez. Estudos mostram que o estresse provoca uma taxa aumentada de abortos, partos prematuros, hipertensão induzida pela gravidez (PIH), diabetes gestacional (GDM) e restrição do crescimento intrauterino (IUGR) no feto (BARUT, BARANSEL, 2024) e influencia o desenvolvimento neural do feto, causando efeitos adversos na vida posterior (BARUT, BARANSEL, 2024). Quanto aos animais que foram testados durante esse período, considerando que a sala de teste comportamental não tem isolamento acústico, o barulho pode ter afetado o comportamento deles nos testes comportamentais. Além disso, o estudo base que foi utilizada para a realização da Imunoativação materna foi feito com uma linhagem de camundongo diferente da utilizada nos experimentos do nosso trabalho, Balb/c (SPINI, et al. 2020), isso pode ter influenciado a falta de diferenças estatísticas esperadas. Por fim, é sabido que as fêmeas são mais fortemente influenciadas por questões hormonais que machos, principalmente no que diz respeito a comportamento como já foi demonstrado por Jaric e colaboradores (2019).

Uma das hipóteses do nosso trabalho era que a administração da inulina na idade de lactação traria benefícios á prole de mães desafiadas imunologicamente durante a gestação, uma vez que existem “janelas temporais” em que a microbiota exerceria forte influência sobre a saúde

do indivíduo. Temos experimentos ainda em andamento, investigando a ação da inulina nesta idade de lactação em prole de machos, bem como em outras idades (adolescência, senescência), em machos e fêmeas. Os resultados serão importantes para conclusões futuras acerca dos benefícios da inulina sobre a microbiota e saúde mental, complementando nossos resultados.

## 6 CONCLUSÃO

Podemos concluir que para as condições do nosso experimento, o tratamento com STAg parece ter prejudicado o comportamento social no teste de Sociabilidade, enquanto a inulina não parece ter revertido tais déficits, tendo os animais se comportado como no grupo controle. Para o Splash test a inulina melhorou o auto-cuidado dos animais, demonstrando efeito benéfico, possivelmente por alteração favorável da microbiota intestinal.

## REFERÊNCIAS

- AGIRMAN, G.; HSIAO, E. Y. SnapShot: The microbiota-gut-brain axis. **Cell**, v. 184, n. 9, p. 2524-2524.e1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.022>.
- AMADIEU, C. *et al.* Restoring an adequate dietary fiber intake by inulin supplementation: a pilot study showing an impact on gut microbiota and sociability in alcohol use disorder patients. **Gut microbes**, v. 14, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.2007042>.
- ANSALDO, E.; FARLEY, T. K.; BELKAID, Y. Control of Immunity by the Microbiota. **Annual Review of Immunology**, v. 39, n. 1, p. 449–479, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-093019-112348>.
- ANSARI, F. *et al.* The Effects of Probiotics and Prebiotics on Mental Disorders: A Review on Depression, Anxiety, Alzheimer, and Autism Spectrum Disorders. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 21, n. 7, p. 555–565, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1389201021666200107113812>
- ASADI, A. *et al.* Obesity and gut–microbiota–brain axis: A narrative review. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 36, n. 5, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcla.24420>
- BARUT, S.; SABANCI BARANSEL, E. Maternal-fetal attachment among pregnant women at risk for mental health: A Comparative Study. **Journal of Clinical Medicine of Kazakhstan**, v. 21, n. 1, p. 67–73, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.23950/jcmk/14265>
- BERDING, K. *et al.* Diet and the Microbiota–Gut–Brain Axis: Sowing the Seeds of Good Mental Health. **Advances in Nutrition**, v. 12, n. 4, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/advances/nmaa181>
- BOULANGER-BERTOLUS, J.; PANCARO, C.; MASHOUR, G. A. Increasing Role of Maternal Immune Activation in Neurodevelopmental Disorders. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00230>.
- BRANISTE, V. *et al.* The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 263, p. 263ra158–263ra158, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009759>

BRITO, V. C. de A. *et al.* Prevalência de depressão autorreferida no Brasil: Pesquisa Nacional de Saúde 2019 e 2013. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 31, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/SS2237-9622202200006.especial>

CAMPOS, A. C. *et al.* Absence of gut microbiota influences lipopolysaccharide-induced behavioral changes in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 312, p. 186–194, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.06.027>.

CHEN, P. *et al.* Administration Time and Dietary Patterns Modified the Effect of Inulin on CUMS-Induced Anxiety and Depression. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 67, n. 8, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mnfr.202200566>.

CODAGNONE, M. G. *et al.* Microbiota and Neurodevelopmental Trajectories: Role of Maternal and Early-Life Nutrition. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 74, n. 2, p. 16–27, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000499144>

CONWAY, F.; BROWN, A. S. Maternal Immune Activation and Related Factors in the Risk of Offspring Psychiatric Disorders. **Frontiers in Psychiatry**, v. 10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00430>

CRYAN, J. F. *et al.* The Microbiota-Gut-Brain Axis. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 4, p. 1877–2013, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>

DALVI-GARCIA, F. *et al.* A model of dopamine and serotonin-kynurenine metabolism in cortisolemia: Implications for depression. **PLOS Computational Biology**, v. 17, n. 5, p. e1008956, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008956>

DOMINGUEZ-BELLO, M. G. *et al.* Role of the microbiome in human development. **Gut**, v. 68, n. 6, p. 1108–1114, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317503>

DUNKEL SCHETTER, C.; TANNER, L. Anxiety, depression and stress in pregnancy. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 25, n. 2, p. 141–148, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/ycp.0b013e3283503680>

FAN, C.-H. .; CAO, J.-H. .; ZHANG, F.-C. . The prebiotic inulin as a functional food - a review. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 15, p. 3262–3265, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27467002/>

FERNÁNDEZ-THEODULOZ, G. *et al.* Social avoidance in depression: A study using a social decision-making task. **Journal of Abnormal Psychology**, v. 128, n. 3, p. 234–244, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1037/abn0000415>

FÜLLING, C.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. Gut Microbe to Brain Signaling: What Happens in Vagus.... **Neuron**, v. 101, n. 6, p. 998–1002, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.02.008>

GÓRALCZYK-BIŃKOWSKA, A.; SZMAJDA-KRYGIER, D.; KOZŁOWSKA, E. The Microbiota–Gut–Brain Axis in Psychiatric Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 19, p. 11245, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms231911245>

HOFFMAN, J. D. *et al.* Dietary inulin alters the gut microbiome, enhances systemic metabolism and reduces neuroinflammation in an APOE4 mouse model. **PLOS ONE**, v. 14, n. 8, p. e0221828, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221828>.

HUO, R. *et al.* Microbiota Modulate Anxiety-Like Behavior and Endocrine Abnormalities in Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 489, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00489>

ISOLAURI, E. Development of healthy gut microbiota early in life. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 48, p. 1–6, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1754.2012.02489.x>

JARIC, I. *et al.* Sex and Estrous Cycle Effects on Anxiety- and Depression-Related Phenotypes in a Two-Hit Developmental Stress Model. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00074>.

JONES, L. A. *et al.* The ever-changing roles of serotonin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 125, p. 105776, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105776>

JÚNIOR, C. A. M. QUESTÕES EM BIOESTATÍSTICA: O TAMANHO DA AMOSTRA. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais - Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies**, v. 1, n. 1, 2009. Disponível em: <https://periodicos.ufjf.br/index.php/riee/article/view/23875>

LI, W. *et al.* Maternal immune activation alters adult behavior, intestinal integrity, gut microbiota and the gut inflammation. **Brain and Behavior**, v. 11, n. 5, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/brb3.2133>

LIANG, S.; WU, X.; JIN, F. Gut-Brain Psychology: Rethinking Psychology From the Microbiota–Gut–Brain Axis. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnint.2018.00033>.

LU, J. *et al.* Effects of Intestinal Microbiota on Brain Development in Humanized Gnotobiotic Mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23692-w>.

MARX, W. *et al.* Major depressive disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00454-1>

MARGOLIS, K. G.; CRYAN, J. F.; MAYER, E. A. The Microbiota-Gut-Brain Axis: From Motility to Mood. **Gastroenterology**, v. 160, n. 5, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.10.066>

MARTIN, C. R. *et al.* The Brain-Gut-Microbiome Axis. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 6, n. 2, p. 133–148, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.04.003>

MORAIS, L. H.; SCHREIBER, H. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 4, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00460-0>

QIN, Y.-Q. *et al.* Inulin: Properties and health benefits. **Food & Function**, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/d2fo01096h>

REYNOLDS, H. M.; BETTINI, M. L. Early-life microbiota-immune homeostasis. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1266876>.

SIMPSON, C. A. *et al.* The gut microbiota in anxiety and depression – A systematic review. **Clinical Psychology Review**, v. 83, p. 101943, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2020.101943>

SPINI, Vanessa B. M. G. *et al.* Maternal Immune Activation with H1N1 or *Toxoplasma gondii* Antigens Induces Behavioral Impairments Associated with Mood Disorders in Rodents. **Neuropsychobiology**, v. 80, n. 3, p. 234–241, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000510791>

SUDO, N. *et al.* Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. **The Journal of Physiology**, v. 558, n. 1, p. 263–275, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063388>

VANDENPLAS, Y. *et al.* Factors affecting early-life intestinal microbiota development. **Nutrition**, v. 78, p. 110812, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.110812>

VOS, T. *et al.* Global Burden of 369 Diseases and Injuries in 204 Countries and territories, 1990–2019: a Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 396, n. 10258, p. 1204–1222, 2020. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9)

WANG, Q.; YANG, Q.; LIU, X. The microbiota-gut-brain axis and neurodevelopmental disorders. **Protein & Cell**, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/procel/pwad026>

YADAV, M. K. *et al.* Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 2, p. 505–521, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11646-8>

YANCKELLO , L.; ET AL. Inulin Supplementation Mitigates Gut Dysbiosis and Brain Impairment Induced by Mild Traumatic Brain Injury during Chronic Phase. **Journal of Cellular Immunology**, v. 4, n. 2, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.33696/immunology.4.132>

YAO, H. *et al.* The microbiota-gut-brain axis in pathogenesis of depression: A narrative review. **Physiology & Behavior**, v. 260, p. 114056, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2022.114056>.

YUAN, Y. *et al.* The relationship between depression and social avoidance of college students: A moderated mediation model. **Journal of Affective Disorders**, v. 300, p. 249–254, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jad.2021.12.119>