



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**Ana Luiza Silva Oliveira**

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DA INULINA SOBRE A MICROBIOTA E  
COMPORTAMENTOS DO TIPO ANSIOSOS EM CAMUNDONGOS C57BL6J  
FÊMEAS E MACHOS, FILHOS DE PROGENITORAS TRATADAS COM  
ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE *Toxoplasma gondii* (STAg)**

**Uberlândia-MG**

**2024**

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DA INULINA SOBRE A MICROBIOTA E  
COMPORTAMENTOS DO TIPO ANSIOSOS EM CAMUNDONGOS C57BL6J  
FÊMEAS E MACHOS, FILHOS DE PROGENITORAS TRATADAS COM  
ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE *Toxoplasma gondii* (STAg)**

Trabalho de Conclusão de Curso ao  
Instituto de Ciências Biomédicas da  
Universidade Federal de Uberlândia  
como requisito parcial para obtenção do  
título de bacharel em Biomedicina  
**Orientadora:** Vanessa Beatriz Monteiro  
Galassi Spini

**Uberlândia-MG**

**2024**

**Ana Luiza Silva Oliveira**

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DA INULINA SOBRE A MICROBIOTA E  
COMPORTAMENTOS DO TIPO ANSIOSOS EM CAMUNDONGOS C57BL6J  
FÊMEAS E MACHOS, FILHOS DE PROGENITORAS TRATADAS COM  
ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE *Toxoplasma gondii* (STAg)**

Trabalho de Conclusão de Curso ao  
Instituto de Ciências Biomédicas da  
Universidade Federal de Uberlândia  
como requisito parcial para obtenção do  
título de bacharel em Biomedicina  
**Orientadora:** Vanessa Beatriz Monteiro  
Galassi Spini

**BANCA EXAMINADORA:**

Profa. Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini (UFU)

Profa. Érika Renata Barbosa Neiro (UFU)

Profa. Cristiane Queixa Tilelli (UFU)

**Uberlândia-MG**

**2024**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado tudo que foi necessário para conseguir realizar os meus objetivos, por ter me apresentado com pessoas incríveis ao longo do caminho e por ter me concebido pais tão maravilhosos.

À minha família por nunca me abandonar e sempre me apoiar em tudo, especialmente ao meu pai, que foi o maior idealizador da minha graduação, mas que infelizmente não poderá ter a oportunidade de ver um dos seus maiores sonhos acontecendo, levarei ele comigo em todas as fases da vida em meu coração.

Ao Brendon, meu marido, por ter me apoiado em momentos felizes e difíceis durante a vida e durante a graduação e por nunca me abandonar durante esse processo.

Aos meus tios que me ajudaram no início e me apoiaram.

À minha orientadora por todo carinho, atenção, apoio e ajuda durante a pesquisa.

As minhas colegas de pesquisa, Agatha e Victoria, que sempre me ajudaram e me apoiaram durante a pesquisa.

Aos professores que contribuíram com todo tempo e conhecimento durante a minha graduação.

À Universidade Federal de Uberlândia que abriu suas portas para minha graduação.

## **Lista de figuras**

**Figura 1:** Via dos transtornos de ansiedade

**Figura 2:** Comunicação entre intestino-cérebro através de vários mecanismos

**Figura 3:** Influência da microbiota na barreira intestinal

**Figura 4:** Os três principais tipos de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

**Figura 5:** Linha do tempo relacionada à composição da microbiota, períodos de desenvolvimento do SNC, idade e desenvolvimento de transtornos neurológicos

**Figura 6:** Janelas temporais para modulação da microbiota

**Figura 7:** Demonstração esquemática de como MIA pode influenciar o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos na prole

**Figura 8:** Cronograma em linha do tempo

**Figura 9:** Estante com caixas moradias com sistema de exaustão

**Figura 10:** Rolha vaginal da fêmea após acasalamento

**Figura 11:** Filhotes sendo tratados via oral utilizando pipeta

**Figura 12:** Dois dos parâmetros possíveis de visualizar e utilizados para avaliação do teste LCE

**Figura 13:** Aparato para realização do teste Labirinto em Cruz Elevado

**Figuras 14 e 15.** Tempo nos braços abertos do aparato

**Figuras 16 e 17.** Tempo gasto nos braços fechados

**Figuras 18 e 19.** Entradas nos braços abertos do aparato

**Figuras 20 e 21.** Entradas nos braços fechados do aparato

**Figuras 22 e 23.** SAP desprotegidos

## RESUMO

O eixo intestino-cérebro é uma comunicação bidirecional que ocorre entre o sistema nervoso central e o intestino, com envolvimento da microbiota intestinal. Sabe-se que o desequilíbrio dessa microbiota está relacionada a transtornos psiquiátricos, enquanto o consumo de fibras insolúveis, os prebióticos, aumenta os microrganismos benéficos e promove a saúde.

Uma vez que modelos animais de Imunoativação materna (MIA) tem sido usados para induzir alterações comportamentais na prole em idade adulta, o presente estudo visou investigar se a indução da MIA utilizando suspensão dos antígenos solúveis de *T. gondii* (STAg) em camundongos fêmeas gestantes da linhagem C57BL6J causa alterações no comportamento da prole, do tipo ansioso, bem como analisar se o prebiótico inulina, administrado durante a lactação, promove neuro proteção na prole adulta por meio da modulação da microbiota. Administramos nas progenitoras STAg ou PBS por injeção intraperitoneal em dose única, aos 16 dias de gestação, enquanto inulina ou água foram administrados via oral à prole diariamente no período de lactação. Para investigar a presença de comportamentos do tipo ansiosos foi realizado o Teste Labirinto em Cruz Elevado. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas se  $p < 0,05$ . Os dados foram apresentados na forma de média  $\pm$  EPM. Nossos resultados mostraram uma “tendência” do desafio imunogênico com STAg em gerar comportamentos do tipo ansiosos, quando analisamos diferentes parâmetros do teste LCE.

Embora as diferenças não tenham sido significativas na prole fêmea cujas mães foram desafiadas com STAg, grupos G3-STAg+água ( $6,5 \pm 10,64$ ) e G4-STAg+inulina ( $234,5 \pm 7,90$ ), observou-se menor tempo de exploração dos braços abertos e aumento do tempo nos braços fechados, comportamentos estes associados a um maior nível de ansiedade. Já na prole constituída por machos, o desafio gestacional com STAg diminuiu significativamente o número de *stretch-attend posture* em área desprotegida, no grupo G4- STAg + inulina ( $3 \pm 0,91$ ) em relação ao G2-PBS+água ( $8 \pm 0,63$ ), denotando um efeito ansiogênico do mesmo. O tratamento com inulina na prole fêmea diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) o número de entradas nos braços fechados do aparato (G2- $10 \pm 12,48$ ), quando comparados aos animais do grupo G1 ( $14 \pm 12,03$ ), demonstrando efeito ansiolítico. Para os demais parâmetros avaliados a inulina não modificou significativamente o comportamento dos animais estudados, embora tenha mostrado uma tendência de efeito ansiolítico. Ajustes na dosagem da inulina podem ser necessários em experimentos futuros para confirmarmos o efeito protetor do uso desse prebiótico em fases iniciais da vida.

**Palavras chave:** Transtornos psiquiátricos, eixo intestino-cérebro, imunoativação maternal, microbiota, inulina, labirinto em cruz elevado.

## ABSTRACT

The gut-brain axis is a bidirectional communication that occurs between the central nervous system and the intestine, with involvement of the intestinal microbiota. It is known that the imbalance of this microbiota is related to psychiatric disorders, while the consumption of insoluble fibers, prebiotics, increases beneficial microorganisms and promotes health.

Since animal models of maternal immunoactivation (MIA) have been used to induce behavioral changes in adult offspring, the present study aimed to investigate whether the induction of MIA using suspension of soluble antigens of *T. gondii* (STAg) in pregnant female mice of the C57BL6J lineage causes changes in the offspring's anxious behavior, as well as to analyze whether the prebiotic inulin, administered during lactation, promotes neuroprotection in adult offspring through modulation of the microbiota. We administered STAg or PBS to the dams by intraperitoneal injection in a single dose, at 16 days of gestation, while inulin or water were administered orally to the offspring daily during lactation. To investigate the presence of anxiety-like behaviors, the Elevated Plus Maze Test was performed. Statistical differences were considered significant if  $p < 0.05$ . Data were presented as mean  $\pm$  SEM. Our results showed a “tendency” of the immunogenic challenge with STAg to generate anxiety-like behaviors, when we analyzed different parameters of the LCE test. Although the differences were not significant in the female offspring whose dams were challenged with STAg, groups G3-STAg+water ( $6.5 \pm 10.64$ ) and G4-STAg+inulin ( $234.5 \pm 7.90$ ), we observed shorter exploration time of the open arms and increased time in the closed arms, behaviors associated with a higher level of anxiety. In male offspring, the gestational challenge with STAg significantly reduced the number of stretch-attend postures in an unprotected area in the G4-STAg + inulin group ( $3 \pm 0.91$ ) compared to the G2-PBS+water group ( $8 \pm 0.63$ ), indicating an anxiogenic effect. Inulin treatment in female offspring significantly reduced ( $p < 0.05$ ) the number of entries into the closed arms of the apparatus (G2- $10 \pm 12.48$ ) when compared to animals in group G1 ( $14 \pm 12.03$ ), demonstrating an anxiolytic effect. For the other parameters evaluated, inulin did not significantly modify the behavior of the animals studied, although it showed a tendency for an anxiolytic effect. Adjustments in the inulin dosage may be necessary in future experiments to confirm the protective effect of using this prebiotic in the early stages of life. **Keywords:** Psychiatric disorders, gut-brain axis, maternal immunoactivation, microbiota, inulin, elevated plus maze.

**Key words:** Psychiatric disorders, gut-brain axis, maternal immunoactivation, microbiota, inulin, elevated plus maze.

## **Lista de abreviações**

**MIA** – Imuno ativação maternal

**STAg** - Antígenos suspensos de *Toxoplasma gondii*

**PBS** – Solução salina tamponada com fosfato

**E0** - Primeiro dia da gestação

**E16** - Décimo sexto dia de gestação

**P3 e P21** – Terceiro a vigésimo primeiro dias pós-nascimento

**P60** – Sessenta dias pós-nascimento

**LCE** – Labirinto em cruz elevado

**TA** – Transtorno de ansiedade

**HHA** – Eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal

**5-HT** - Serotonina

**CRH** – Hormônio Corticotropina

**ACTH** - Hormônio adrenocorticotrópico

**BHE** - Barreira hematoencefálica

**SNC** – Sistema nervoso Central

**SNE** – Sistema nervoso Enterico

**AGCC** - Ácidos graxos de cadeia curta

**BP** - Barreira Placentária

**TGI** - Trato gastrointestinal

**IL-6** – Interleucina 6

**IL-17** – Interleucina 7

**SAP** - Streckhaltendposture

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1 Os transtornos psiquiátricos .....	12
1.2 Eixo intestino-cérebro .....	14
1.3 Prebióticos e inulina .....	21
1.4 Imunoativação materna .....	22
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	25
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	25
3.1 Objetivos gerais .....	25
3.2 Objetivos específicos .....	25
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	26
4.1 Animais experimentais .....	26
4.2 Delineamento experimental .....	27
4.3 Imunoativação materna com antígenos solúveis de <i>Toxoplasma</i> .....	29
4.4 Inulina .....	29
4.5 Teste comportamental Labirinto em cruz Elevado (LCE) .....	29
4.6 Destino dos animais após os experimentos .....	30
4.7 Análise Estatística .....	31
<b>5. RESULTADOS</b> .....	31
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	34
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	36
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	37

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Os transtornos psiquiátricos

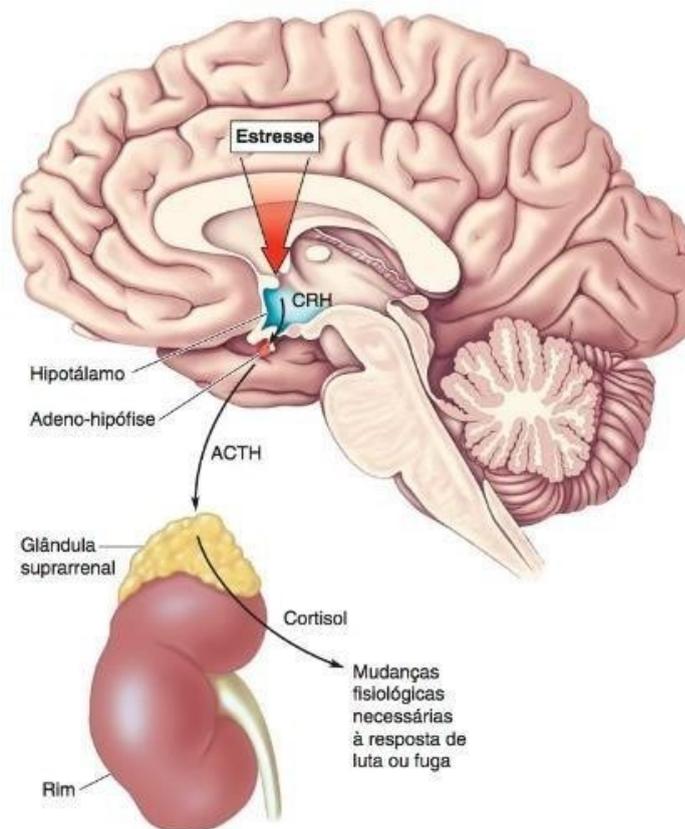
Os transtornos psiquiátricos podem ser definidos como qualquer perturbação que afete diretamente os aspectos cognitivos ou emocionais do indivíduo, prejudicando de forma direta o convívio social, além de incapacidade da realização de tarefas simples do dia a dia em diversas áreas da vida (OPAS/OMS). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2019 cerca de 970 milhões de pessoas no mundo viviam com algum transtorno mental, sendo que em 2020 devido a pandemia da COVID-19 houve um aumento significativo dos transtornos do tipo ansiosos e depressivos. O Brasil está entre um dos países com maior número de pessoas ansiosas e estima-se que 9,3% da população sofre com essa comorbidade (OMS, 2022). A saúde mental depende de vários fatores, incluindo a genética, nutrição, alterações maternas na fase pré-natal, infecções perinatais, mas também fatores sociais, culturais e econômicos (OPAS/OMS). Atualmente existe uma gama de transtornos mentais tais como: ansiedade, depressão, transtorno obsessivo compulsivo, fobia social e outros (Santos et al., 2022).

A ansiedade é uma reação emocional normal e necessária para sobrevivência, onde há um estímulo para o início do sinal de alerta, podendo apresentar sintomas físicos e psicológicos, com a finalidade de se proteger contra ameaças externas. Esse tipo de ansiedade é normal e não impossibilita ou impede que o indivíduo tenha uma vida normal (Guimarães et al., 2015). Por outro lado, o transtorno de ansiedade (TA) caracteriza-se como patológico quando o indivíduo passa a ter episódios de ansiedade excessivas sem razões aparentes e que interfira nas suas atividades do cotidiano. Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), a ansiedade é caracterizada por sentimentos de preocupação excessiva e tensão, estendendo-se aos sintomas físicos, tais como taquicardia, agitação, sudorese, calafrios, nervosismo, alterações gastrointestinais (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION DSM-5 ®).

Sabe-se que o estímulo constante de medo e estresse geram respostas fisiológicas que envolvem áreas encefálicas como amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal, dentre outras, relacionadas à gênese do TA. Além disso, a ativação constante de circuitos do Sistema Nervoso Autônomo Simpático provoca respostas conhecidas como mecanismo de “luta ou fuga”, com aumento da liberação de cortisol, noradrenalina e adrenalina pelas adrenais (Hannibal and Bishop., 2014). Estudos tem relacionado o aumento crônico do cortisol e

diminuição da serotonina como interferentes no funcionamento do hipocampo, alterando cognição e emoção, desencadeando os sintomas do TA (Joca et al., 2007; Margis et al., 2003).

Acredita-se que a ansiedade é expressa quando regiões da amígdala estimula o hipotálamo e promove a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). Nesta via, o hipotálamo libera o hormônio liberador de corticotropina (CRH), que por sua vez estimula a adenohipófise a liberar o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). Este hormônio, ao cair na circulação, estimula a glândula suprarrenal a liberar glicocorticoides como o cortisol, conhecido como hormônio do estresse (figura 1) (Sousa et al., 2015). Embora ele apresente inúmeras ações importantes que preparam o corpo para situações de estresse, quando liberados cronicamente, durante quadros de ansiedade, prejudicam algumas funções fisiológicas, afetando memória, comportamento, imunidade e metabolismo (Hannibal and Bishop., 2014).



**Figura 1: Via Hipotálamo-hipófise-adrenal** Fonte: BEAR, Mark., 2017.

Por outro lado, o desequilíbrio de alguns neurotransmissores parece estar envolvido também na gênese da ansiedade. Por exemplo, o GABA é capaz de inibir a excitabilidade

neuronal causando relaxamento e caso seus níveis estejam diminuídos ocorre aumento da ansiedade. Outro exemplo é a serotonina (5-HT): cerca de 95% são produzidas pelas células enteromarfins no epitélio do trato gastrointestinal (TGI) ou pelos neurônios serotoninérgicos do Sistema Nervoso Central (SNC) e uma pequena parte nas plaquetas sanguíneas (Vedovato et al., 2015), sendo que o aminoácido triptofano obtido na dieta também contribui para sua produção (Margolis et al., 2023). Esse neurotransmissor atua no organismo regulando humor, sono, motilidade intestinal, cognição. Sendo que a deficiência desse neurotransmissor inibe a capacidade do cérebro de regular ameaças (Foster and McVey Neufeld., 2013).

A neuroinflamação também é considerada um processo capaz de moldar a função cerebral. A ativação do sistema imunológico durante infecções ou inflamações intestinais, recrutam células imunes que liberam citocinas pró-inflamatórias capazes de causar uma resposta inflamatória sistêmica e afetar o sistema nervoso central, podendo impactar a barreira hematoencefálica (BHE) e conseqüentemente causar danos a função neuronal (Dinan and Cryan., 2017). Uma vez que a microbiota intestinal pode influenciar o SNC, por diferentes vias, incluindo a imunomodulação (Sharon et al., 2016). Pesquisadores tem mostrado que alterações na microbiota materna durante a gestação, mediada pelo uso de antibióticos, dieta, ativação imunológica e estresse, são capazes de comprometer o neurodesenvolvimento e causar alterações comportamentais (ansiedade, autismo) na prole de roedores e humanos (Borre et al., 2014).

Acredita-se, portanto, que o transtorno de ansiedade possa ter origem multifatorial. Como somos seres biopsicossociais, fatores genéticos ou biológicos, ambientais e sociais, além do estresse, possam estar relacionados ao desenvolvimento dessa patologia (Huang and Wu 2021; Naufel et al., 2023).

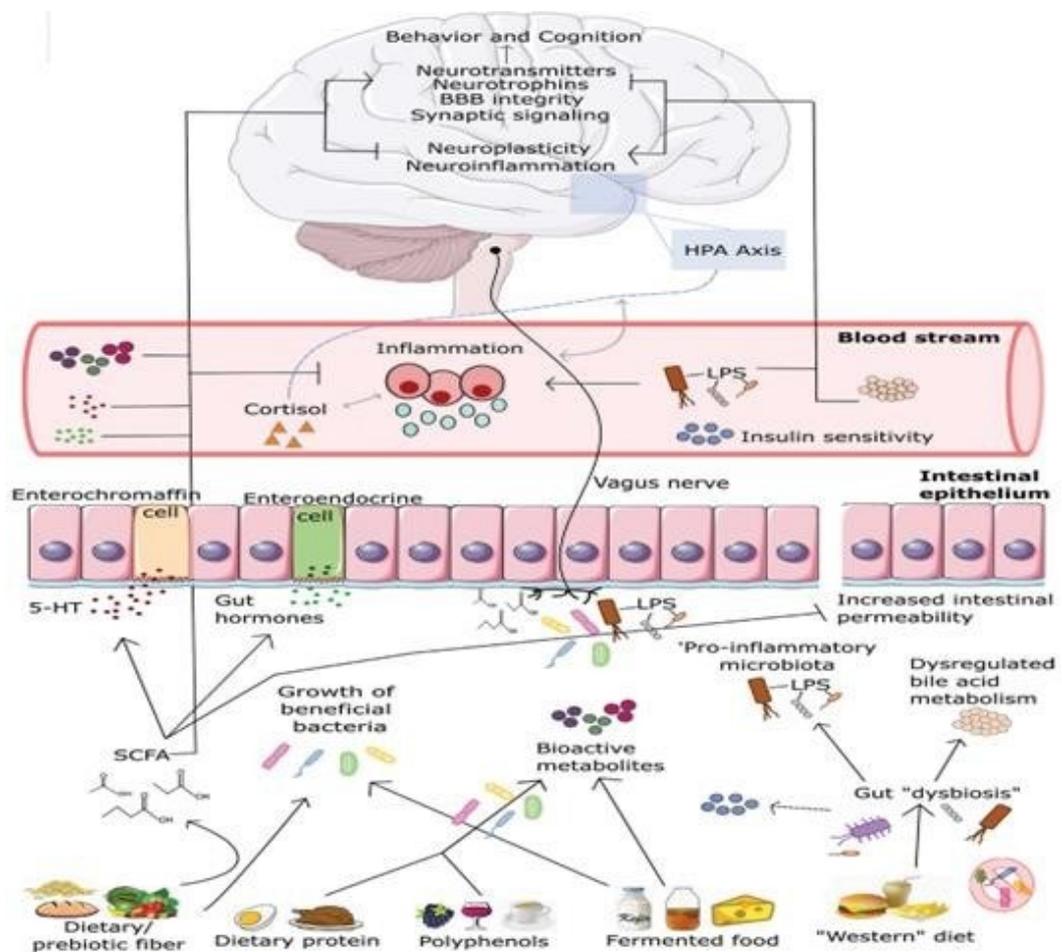
## **1.2 Eixo intestino-cérebro**

A relação intestino-cérebro aumentou o interesse no meio científico devido as descobertas de que a atividade intestinal pode impactar na cognição e comportamento, estando o “eixo intestino-cérebro”, como foi chamado, associado a distúrbios mentais (Allen et al., 2017). Esse eixo é constituído por uma rede complexa de interações que incluem o sistema imunológico, endócrino, metabolismo de neurotransmissores, atividade do nervo vago, sistema nervoso entérico (SNE), sistema nervoso central e substâncias geradas por bactérias, formando um sistema de interação bidirecional, entre o cérebro e o intestino (Ferreira et al., 2023).

Vale ressaltar que o SNE, responsável pela função intestinal adequada, é chamado de “segundo cérebro” pois possui uma rede neuronal complexa (Wolterink et al., 2022).

Segundo pesquisadores, a microbiota intestinal regula diversas funções cerebrais a partir da secreção de metabólitos (como acetato, propionato e butirato), citocinas e neurotransmissores, sendo que tais secreções atuam no SNC (Silva et al., 2020).

O nervo vago, conhecido como um dos maiores nervos do corpo, origina-se no tronco encefálico e estende-se ao longo do tronco até o abdômen. É composto por fibras nervosas sensoriais (aférentes) e motoras (eferentes) sendo considerado a principal via de transporte de informações do SNE para o SNC (Breit et al., 2018). O cérebro também interage com o intestino por meio do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e sistema nervoso autônomo (figura 2). Ou seja, os sinais cerebrais são transmitidos e chegam ao intestino, onde este recebe e retransmite para o cérebro informações viscerais (Carabotti et al., 2015).

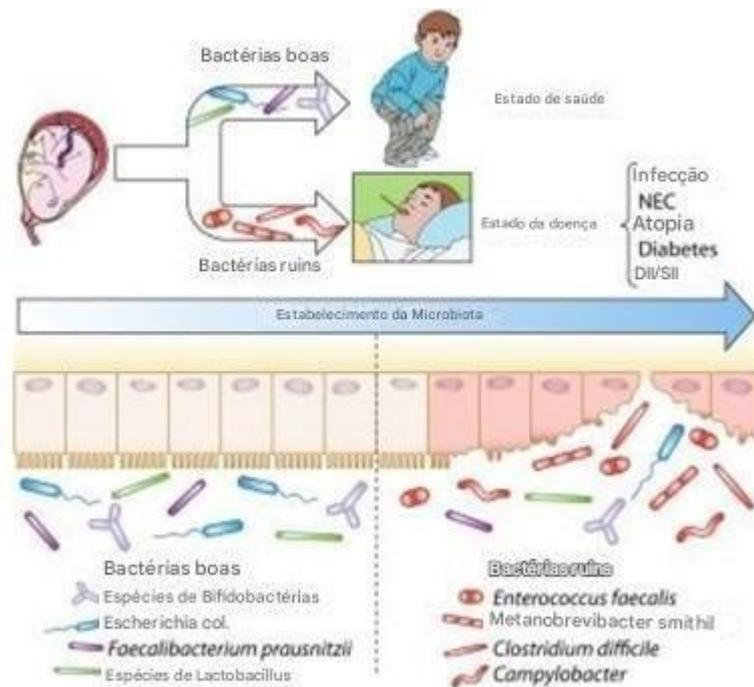


**Figura 2: Comunicação ntre intestino-cérebro através de vários mecanismos:** Um ambiente simbiótico, colonizado por bactérias benéficas é capaz de estimular a produção de neurotransmissores (5-HT) e hormônios intestinais, capazes de afetar o cérebro e o comportamento, por vias de sinalização diretas ou indiretas. O nervo vago representa uma outra via de comunicação, possível de ser estimulada pela composição da microbiota. Em contrapartida, uma dieta “desequilibrada” rica em gordura e açúcares, favorece um ambiente disbiótico, aumento da permeabilidade da barreira intestinal e passagem de moléculas pró-inflamatórias. Essa condição pode causar neuroinflamação e alterações metabólicas devido a inflamação intestinal. **Fonte:** Berding et al., 2024.

O sistema nervoso entérico interage com o sistema imunológico intestinal, monitorando a microbiota e respondendo a processos inflamatórios. Esses sistemas estão conectados ao sistema nervoso central pelo nervo vago, que transmite sinais ao cérebro quando o SNE detecta alterações, como inflamações ou disbiose, desencadeando respostas neuroinflamatórias. Além disso, o SNE regula células imunológicas locais, como linfócitos e macrófagos, que, ao serem ativadas, liberam citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas são transportadas pelo sistema circulatório e ao atingirem o SNC podem ativar a microglia e induzir a produção de mais citocinas inflamatórias, estimulando áreas associadas ao estresse e à modulação emocional, como o hipotálamo e o sistema límbico. Esses processos podem

contribuir para o desenvolvimento de transtornos neurológicos, como ansiedade e depressão (Foster and McVey Neufeld., 2013; Fülling, Christine et al., 2019; Margolis et al., 2023).

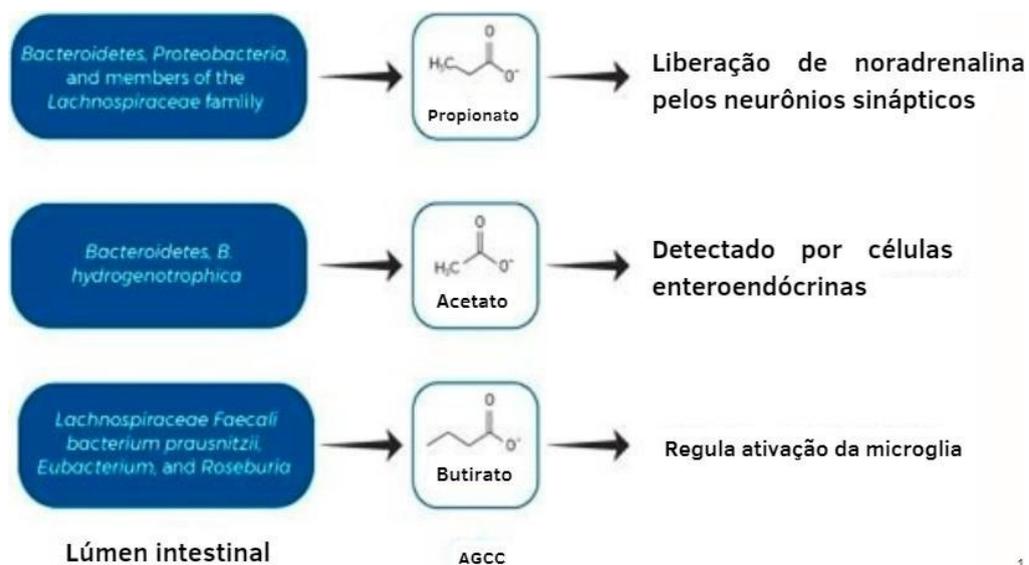
A microbiota intestinal também influencia a integridade da barreira intestinal, controlando passagem de moléculas do lúmen para lâmina própria, local onde encontra-se células imunes, além de extremidades terminais de neurônios do sistema nervoso entérico. A disfunção da barreira intestinal ou um intestino permeável, permite a passagem de moléculas como citocinas pró inflamatórias que ativarão as cascatas inflamatórias. Acredita-se que o enfraquecimento dessa barreira está envolvido no desenvolvimento de patologias neuropsiquiátricas (figura 3) (Rios et al., 2017).



**Figura 3: Influência da microbiota na barreira intestinal:** Um ambiente simbiótico contribui com a integridade da barreira intestinal promovendo saúde. O contrário acontece em um ambiente de disbiose, em que há fragilidade da barreira intestinal, contribuindo para o surgimento de doenças. **Fonte:** Adaptado de Milani et al., 2017.

*Bacillota* (ou *Firmicutes*) e *Bacteroidota* (ou *Bacteroidetes*), são os dois principais filos de bactérias que compõe cerca de 90% da microbiota intestinal, dividindo-se em gêneros como *Lactobacillus*, *Bacillus*, e *Clostridium*. Os outros 10% são colonizadas pelo filo *Actinobacterias* representado principalmente pelo gênero *Bifidobacterium* e pelos filos *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobiota*. A presença dessas bactérias é usada como marcador da função intestinal positiva. Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são produtos produzidos pela ação de bactérias do colón, a partir da fermentação anaeróbia de fibras ingeridas na dieta e estão envolvidos em várias funções reguladoras. Estudos tem demonstrado

que os AGCC são capazes de estimular a secreção de serotonina (5-HT), ativação do nervo vago e outras vias. O acetato, propionato e butirato citados anteriormente (figura 4), são subprodutos gerados a partir de fibras alimentares não digeríveis. Possuem inúmeros benefícios, dentre eles podemos destacar, neuroproteção, integridade da barreira epitelial/intestinal, modulação do sistema imunológico e proteção contra patógenos. O desequilíbrio dessa microbiota, em termos de quantidade e diversidade de bactérias, conhecidas como disbiose, diminui a produção desses metabólitos, interferindo diretamente na saúde cerebral, visto que o intestino consegue por diversas vias se comunicar com o cérebro (Labetoulle et al., 2024); (Koblinsky et al., 2016).



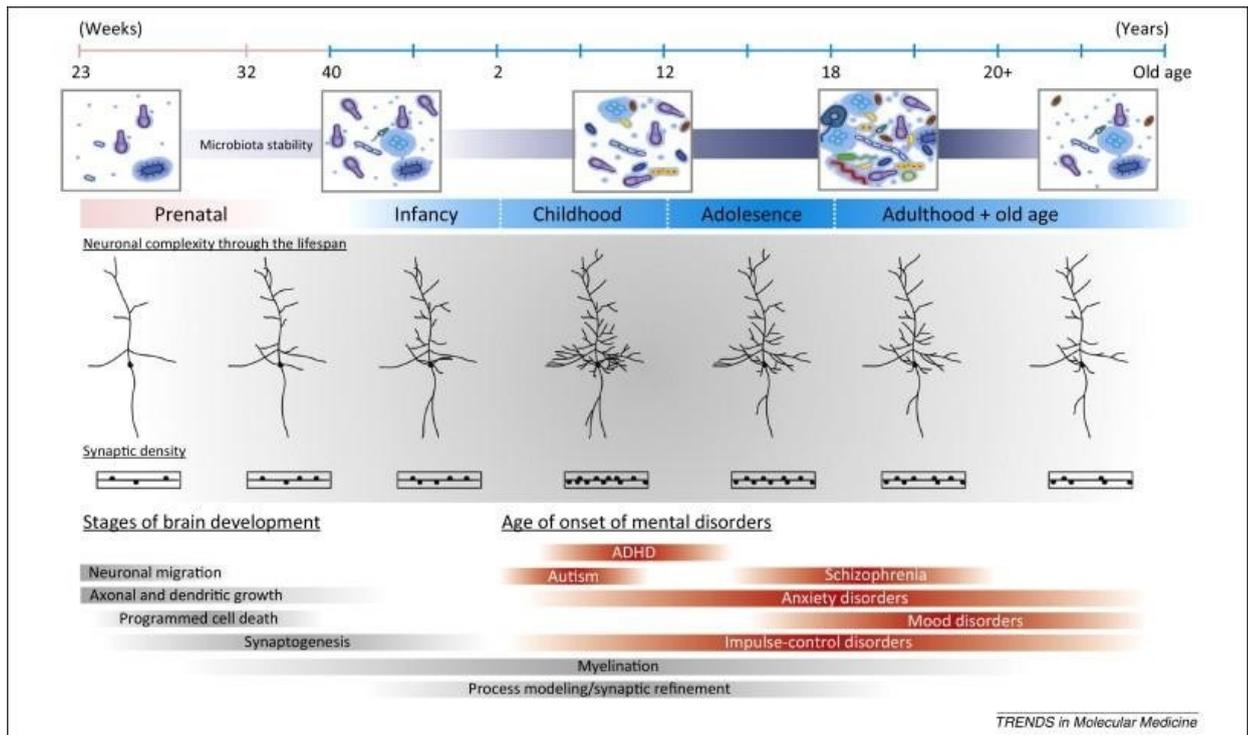
**Figura 4:** Os três principais tipos de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC): À esquerda os principais táxons bacterianos que produzem esses AGCC e as principais ações. **Fonte:** Adaptado de Labetoulle et al., 2024.

Com o intuito de demonstrar essa relação entre a microbiota e transtornos psiquiátricos, estudos pré-clínicos, avaliaram o nível de ansiedade a partir da dosagem de corticosterona em camundongos. Observou-se que camundongos livres de microrganismos tiveram o nível de ansiedade maior em comparação ao grupo controle que possuía microbiota intestinal. Esse estudo comprova a importância da microbiota sobre o funcionamento neural (Flowers et al., 2020).

Em modelos de depleção de microbiota pesquisadores utilizaram a relação da microbiota com doenças psiquiátricas. Pesquisadores utilizaram o transplante fecal, feito entre pessoa para animal, com o intuito de analisar se a transferência da microbiota intestinal de uma pessoa sintomática para doenças do SNC/SNE poderia induzir sintomas no animal saudável. Os animais demonstraram sintomas de doenças neurodegenerativas como: depressão, ansiedade, Parkinson, sugerindo que a microbiota pode estar relacionada a esses tipos de

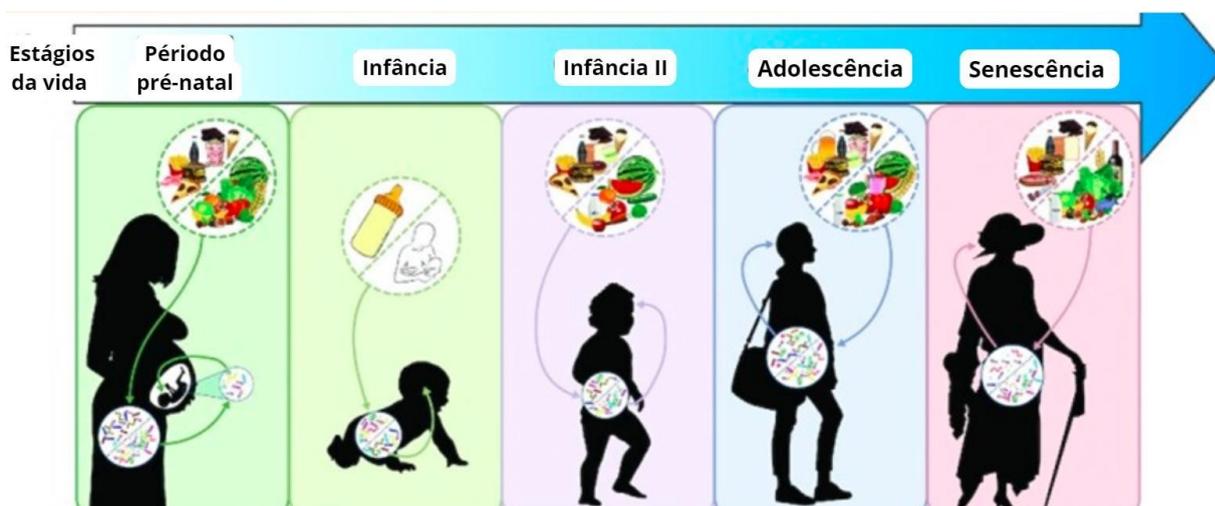
transtornos. Segundo o estudo as bactérias benéficas ainda são capazes de estimular a produção de neurotransmissores, um exemplo é GABA estimulado por *Bifidobacterium e Lactobacillus*. Tal neurotransmissor, contribui para o controle dos sintomas ansiosos e em baixas concentrações há maior suscetibilidade aos sintomas do tipo ansiosos (Strandwitz., 2018).

A microbiota intestinal de um indivíduo inicia sua colonização no final da gestação e continua logo após o nascimento, permanecendo estável até seus 2 ou 3 anos de idade (Milani et al., 2017). Entre os três meses e dois/três anos de idade o cérebro dos neonatos continua a se desenvolver e cresce de 30 a 90% do seu futuro volume adulto, esse período, é caracterizado por um pico de formação de neurônios e novas sinapses, coincidindo com a colonização e composição da uma microbiota (figura 5) (Christian et al., 2015). Alterações da microbiota nas fases de desenvolvimento do sistema nervoso central podem gerar problemas de neurodesenvolvimento na prole (Borre et al., 2014).



**Figura 5: Linha do tempo relacionada à composição da microbiota, períodos de desenvolvimento do SNC, idade e desenvolvimento de transtornos neurológicos:** No final da gestação a microbiota do feto começa a se estabilizar e evoluir, acompanhando a neurogênese. A complexidade de neurônios e densidade das sinapses aumentam no período da primeira e segunda infância até a adolescência. Esses estágios, incluem processos como migração neuronal, crescimento de axônios e dendritos, sinaptogênese e posteriormente a diminuição das sinapses (iniciando na adolescência até a velhice). A mielinização (importante para condução rápida dos impulsos nervosos) ocorre progressivamente. Durante as janelas críticas do desenvolvimento, o indivíduo fica vulnerável a agentes estressores e patogênicos. **Fonte:** Borre et al., 2014.

Cada pessoa possui uma microbiota única, cuja composição inicial é influenciada principalmente pelo tipo de parto e pelo tipo de alimentação nos primeiros meses de vida (aleitamento materno ou fórmula infantil). No entanto, essa microbiota pode sofrer alterações ao longo da vida devido a fatores como uso prolongado de medicamentos, infecções, inflamações, estresse, dieta, estilo de vida, envelhecimento, entre outros (Cenit et al., 2017). Sabe-se que existem “janelas temporais”, durante a vida do indivíduo, em que modificações da microbiota podem impactar de forma significativa sobre sua saúde física e mental. Acredita-se que esses períodos compreendam a fase de lactação, adolescência, gestação e senescência (figura 5 e 6) (Ihekweazu and Versalovic., 2018; Ferreira, et al., 2023).



**Figura 6: Janelas temporais para modulação da microbiota:** Fatores que influenciam na composição da microbiota durante diferentes fases da vida. **Fonte:** Adaptado de Berding et al., 2024.

### 1.3 Prebióticos e inulina

Parte da microbiota do indivíduo é proveniente da mãe, sendo que os metabólitos das bactérias maternas, ao serem absorvidos para corrente sanguínea e direcionados para a placenta, ajudam a regular algumas funções fisiológicas no feto, impactando no neurodesenvolvimento e regulação do seu sistema imunológico (Tian et al., 2023).

O primeiro contato que o ser humano tem com o consumo de prebiótico é pelo leite materno, que contém galacto-oligossacarídeo. O prebiótico é um nutriente indigerível pelo trato gastrointestinal humano, mas que é capaz de estimular seletivamente o crescimento de algumas espécies de bactérias, trazendo muitos benefícios para o organismo, dentre eles a inibição do crescimento de patógenos e um intestino funcional. Já os probióticos são organismos vivos que podem ser consumidos em diferentes fases da vida humana, capazes de trazer benefícios a saúde a partir da sua ingestão (Morais and Jacob, 2006).

O consumo de prebióticos tem sido muito discutido e por isso despertou interesse na população e na comunidade científica, devido a sua capacidade de modificar a microbiota intestinal humana positivamente, aumentando o número e diversidade de bactérias benéficas, melhorando a função útil dos microrganismos intestinais que ao fermentarem fibras alimentares, aumentam a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) (Tawfick et al., 2022).

Estudos tem mostrado que a inulina, um carboidrato extraído principalmente da raiz da chicória, mas também encontrada em alimentos como alho-poró, cebola e vegetais, consiste em importante prebiótico. Quando degradado, origina um fruto oligossacarídeo resistente à acidez gástrica, à hidrólise por enzimas gastrintestinais e absorção gastrintestinal,

conseguindo chegar ao cólon sem ser absorvida, sendo então fermentada por bactérias benéficas do intestino (Divyashri et al., 2023). Um estudo feito em ratos demonstrou inúmeros benefícios da administração da inulina durante a gestação, dentre eles a diminuição do estresse oxidativo no cérebro materno e fetal e aumento de *Bifidobacterias e Lactobacteria* (bactérias intestinais benéficas) no intestino dos ratos suplementados com inulina (Krishna and Muralidhara, 2015).

Um outro estudo mostrou o papel da inulina como reguladora do metabolismo da glicose, lipídios, aminoácidos e também efeitos imunológicos intestinais e imunomoduladores sistêmicos, tendo sido possível observar que a inulina tem o potencial de contribuir positivamente contra muitas doenças, como doença renal crônica, síndromes metabólicas, doenças inflamatórias intestinais, disbiose intestinal, doenças alérgicas e tumores relacionados ao desequilíbrio imunológico, provavelmente por modulação da microbiota (Sheng, Wei et al., 2023).

#### **1.4 Imunoativação maternal**

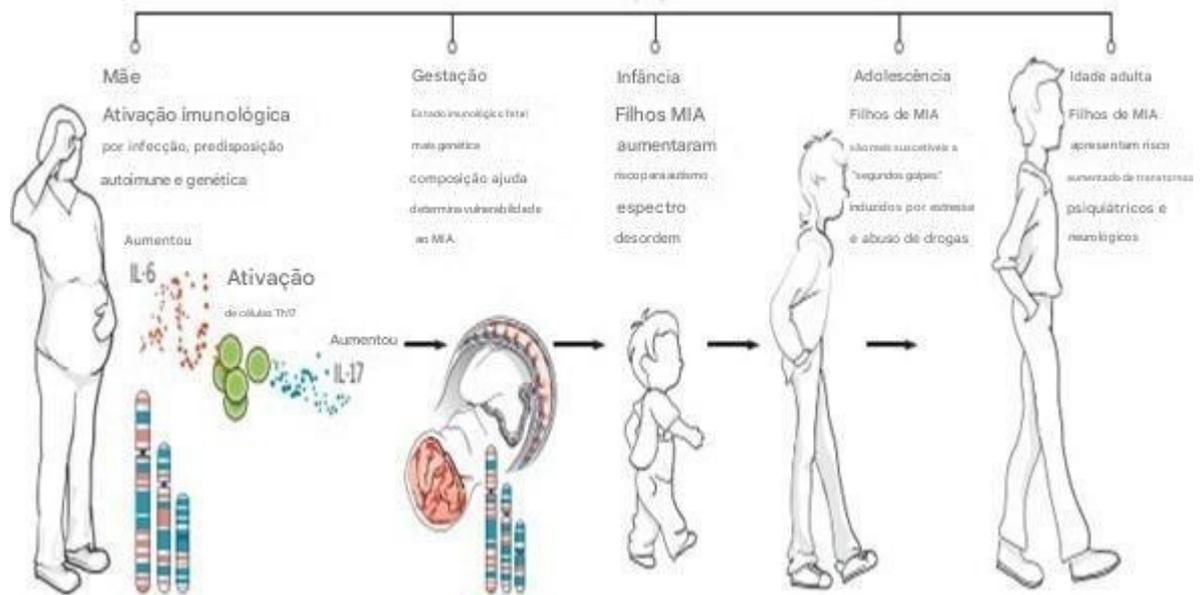
O sistema imunológico está distribuído por todo o corpo humano e é composto por células e moléculas efetoras que oferecem proteção contra diversas patologias e lesões. Sua ativação ocorre na presença de patógenos, seus subprodutos, ou devido a lesões, desencadeando uma resposta imune que protege o hospedeiro de danos causados por microrganismos ou traumas (Murphy, 2016). Além disso, a comunicação bidirecional entre o sistema imunológico e o sistema nervoso, mediada por sinalizações de citocinas e neurônios, é capaz de promover neuroinflamação à modular o desenvolvimento de transtornos neurológicos (Marques-Deak e Sternberg, 2004).

A exposição a infecções no período gestacional é muito comum, principalmente no inverno. Na década de 1960 houve um aumento de casos com complicações na gestação e no parto, devido à pandemia da rubéola, sendo possível observar que havia um vínculo entre a infecção materna pelo vírus da rubéola com defeitos congênitos físicos e cognitivos em fetos afetados (Hall et al., 2023). Um estudo de coorte feito em Nova York, observou uma correlação entre a síndrome da rubéola congênita e o diagnóstico de autismo (Mawson and Croft et al., 2019). Um outro estudo observou que a exposição pré-natal à rubéola estava associada ao risco de esquizofrenia na idade adulta (Hall et al., 2023). Outros tipos de infecção durante a gestação como a toxoplasmose, gripe, infecções bacterianas e outros agentes patogênicos, são capazes de aumentar o risco de desenvolver doenças psiquiátricas na prole (Massarali et al., 2022).

Sabe-se que as redes neurais são formadas durante o desenvolvimento fetal, um período crítico tanto para a mãe quanto para o feto. Alterações neurológicas nesse estágio podem impactar negativamente o desenvolvimento fetal, resultando em possíveis efeitos ao longo da vida, como ansiedade, depressão e autismo (Han et al., 2021).

Nesse contexto, modelos animais de imunoativação materna (MIA) referem-se a modelos em que um insulto imunogênico é dado a fêmea em algum momento da gestação, induzindo mudanças no neurodesenvolvimento do feto. Estudos tem mostrado que o período da gestação em que o insulto imunogênico é aplicado pode determinar o tipo de alteração do sistema neural que ocorrerá na prole. Por exemplo, insultos que ocorrem entre o 1º e 2º trimestre da gestação tem demonstrado maior probabilidade em gerar prole com transtornos neuropsiquiátricos (Estes and McAllister., 2016). Esse período é caracterizado por várias mudanças, hormonais, bioquímicas, físicas e psicológicas no corpo da mãe, que podem ter impacto sobre o sistema neural do feto (Pereira and Lovisi., 2008).

Existem teorias de que o ambiente intrauterino é estéril, porém algumas evidências vêm mostrando que a presença de bactérias nesse ambiente pode influenciar a microbiota do feto antes do nascimento. Apesar disso, o útero é considerado um ambiente altamente seguro, que promove proteção ao feto através da barreira placentária (BP). Está juntamente com a barreira hematoencefálica fetal, impede o transporte de substâncias tóxicas ou qualquer outro agente agressor e prejudicial ao embrião e ao mesmo tempo permite a passagem de nutrientes úteis para o desenvolvimento fetal. Entretanto, algumas vezes essas barreiras podem sofrer alterações e permitir a passagem de substâncias ao feto vindas do sistema periférico e sangue materno (Mishra et al., 2009). Microrganismos, como vírus, fungos ou bactérias, ao estimularem o sistema imunológico materno, induzem a produção de citocinas como IL-6, IL 17 e mediadores químicos, que podem cruzar a barreira placentária e hematoencefálica podendo comprometer o neurodesenvolvimento fetal e alterar o comportamento da prole em idade adulta (Figura 7) (Estes and McAllister, 2016).



**Figura 7: Demonstração esquemática de como MIA pode influenciar o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos na prole:** Histórico genético, estado autoimune, disbiose, epigenética na infância e adolescência (utilização de antibióticos, estresse, uso de drogas) juntamente com as consequências da infecção materna pode aumentar as chances de a prole desenvolver transtornos psiquiátricos pós-natais **Fonte:** Adaptado de Estes and McAllister, 2016.

Outros fatores como estresse psicossocial, aumento de gordura corporal e disbiose também induzem uma resposta imunológica no corpo da mãe (Kwon et al., 2022; Bergdolt and Dunaevsky, 2019; Manti et al., 2023). Portanto, considerando-se a interação bidirecional entre o eixo intestino-cérebro, acredita-se que a disbiose materna (influenciada por fatores como dieta, ativação imunológica materna e uso de medicamentos) pode interferir no desenvolvimento neural do feto, uma vez que sua colonização intestinal é impactada por eventos que ocorrem durante a gestação (Sajdel-Sulkowska., 2023).

Durante o período embrionário a MIA é capaz de causar danos ao córtex cerebral, diminuindo atividade cerebelar e aumentando apoptose de neurônios e células da glia (Mastenbroek et al., 2024). Estudos tem mostrado que mães expostas a MIA geraram proles que apresentaram um desequilíbrio em sistemas dopaminérgicos, serotoninérgicos, glutamatergicos, e GABAérgicos, demonstrando que a exposição influencia na vida pré-natal e pós-natal (Gumusoglu et al., 2017). Com base em todas essas informações, modelos animais de MIA têm sido usados para acessar comportamentos semelhantes aos observados em pacientes com esquizofrenia, autismo, ansiedade, depressão, dentre outros (Kwon et al., 2022). Majerczyk e colaboradores (2022) ao trabalhar com camundongos, encontraram comportamentos semelhantes ao do espectro autista, em prole de mães que haviam sido infectadas por poli (I:C),

reforçando que a ativação imune materna resulta em aumento de citocinas pro-inflamatórias e danos ao sistema neural fetal. Spini e colaboradores (2020) encontraram comportamentos do tipo ansiosos e depressivos em camundongos prole de mães desafiadas imunologicamente com antígenos suspensos na vacina influenza trivalente e STAg.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Uma vez que a disbiose está correlacionada à alteração do eixo intestino-cérebro, predispondo ao surgimento de distúrbios psiquiátricos que estão cada vez mais prevalentes na população, impactando em seu bem-estar geral e produtividade, e uma vez que a inulina tem se destacado como importante prebiótico de fácil acesso à população, estudos que buscam elucidar o impacto do uso de prebióticos, sobre a modulação da microbiota em épocas específicas da vida, bem como seus efeitos sobre os transtornos de ansiedade, podem contribuir para estratégias de prevenção e tratamento de tais distúrbios.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivos gerais**

Investigar um possível efeito neuroprotetor da inulina, administrada durante a fase de lactação a camundongos C57BL/6J, filhos de mães desafiadas com STAg no período gestacional E16, sobre comportamentos do tipo ansiosos.

### **3.2 Objetivos específicos**

- 1-Desafiar imunologicamente fêmeas de camundongos C57BL/6J com antígenos solúveis de *Toxoplasma*, durante a idade gestacional E16;
- 2-Analisar, por meio do teste Labirinto em Cruz Elevado, se a imunoativação materna com STAg em E16 provoca comportamentos do tipo ansiosos na prole fêmeas e machos em idade adulta (P60);
- 3-Avaliar se a administração de inulina, via oral durante o período de lactação na prole (fêmea e macho) oriunda de mães tratadas durante a gestação, exerce efeito neuroprotetor, revertendo os comportamentos do tipo ansiosos, medidos pelo teste Labirinto em Cruz Elevado.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Animais experimentais

Camundongos da linhagem C57BL/6J, foram fornecidos pela Rede de Biotérios (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia em projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo 23117.037394/2022-63. Os animais foram acondicionados no mesmo local, mantendo-se as condições padrões de luz (12h:12h, claro-escuro) com acesso livre à água e ração. As caixas moradias possuem bebedouros individuais e são trocadas e higienizadas semanalmente e contam com sistema de exaustão que controla o fluxo de ar (figura 9).

É importante ressaltar que as fêmeas apresentam ciclo estral, podendo variar seu comportamento conforme os níveis de hormônios se modificam, resolvemos testar machos e fêmeas, embora não tenhamos feito o estadiamento do ciclo estral.



**Figura 9:** Estante com caixas moradias com sistema de exaustão. Fonte: Autores, 2023

Os filhotes foram obtidos por meio de acasalamento, tendo sido os animais colocados na proporção de um macho para duas fêmeas. As fêmeas foram monitoradas diariamente sendo que as fêmeas que apresentaram rolha vaginal (uma mistura de secreções vaginais e sêmen) foram consideradas no dia E0 da gestação (Figura 10).



**Figura 10: Rolha vaginal da fêmea após acasalamento. Fonte: Autores 2023**

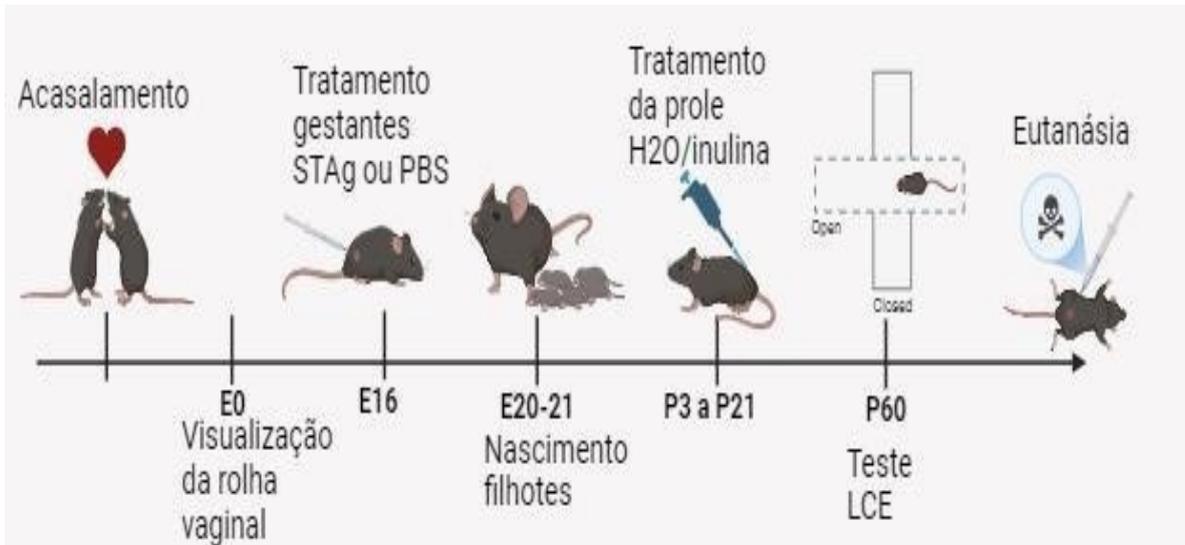
As fêmeas gestantes foram divididas em dois grupos:

- 1- Tratadas com uma injeção única de STAg, via intraperitoneal em E16;
- 2- Tratadas com uma injeção única de tampão PBS, via intraperitoneal em E16.

Durante o período de gestação as progenitoras foram monitoradas diariamente, até que ocorresse o nascimento (por volta de 21 dias após a concepção) e o desmame dos filhotes (por volta de 21 dias após o nascimento).

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, os animais foram separados em machos e fêmeas e colocados em gaiolas com quantidade máxima de 5 animais, sendo mantidos dessa forma até atingirem a idade adulta de 60 dias pós-nascimento (P60) quando finalmente estavam aptos à realização do teste comportamental. Os animais ainda foram subdivididos em quatro grupos, tanto para fêmeas como para machos.

## 4.2 Delineamento experimental



**Figura 8: Cronograma em linha do tempo.** Fonte: Criado com Biorender, 2024.

### Fêmeas

**Grupo 1 *PBS e H2O (G1)*** – Filhotes fêmeas de progenitoras tratadas via intraperitoneal com PBS em E16, receberam 50 uL de água destilada do 3° ao 21° dia pós-nascimento (P3 a P21), (n=10);

**Grupo 2 *PBS e Inulina (G2)*** - Filhotes fêmeas de progenitoras tratadas via intraperitoneal com PBS em E16, receberam 50 uL de inulina a 10% em P3 a P21 (n=10);

**Grupo 3 *STAg e H2O (G3)*** - Filhotes fêmeas de progenitoras tratadas via intraperitoneal com STAg em E16, receberam água destilada em P3 a P21 (n=9);

**Grupo 4 *STAg e Inulina (G4)*** - Filhotes fêmeas de progenitoras tratadas via intraperitoneal com STAg em E16, receberam 50 uL de inulina a 10%, de P3 a P21, (n=10).

### Machos

**Grupo 1 *PBS e H2O (G1)*** – Filhotes machos de progenitoras tratadas via intraperitoneal com PBS em E16, receberam 50 uL de água destilada do 3° ao 21° dia pós-nascimento (P3 a P21), (n=6);

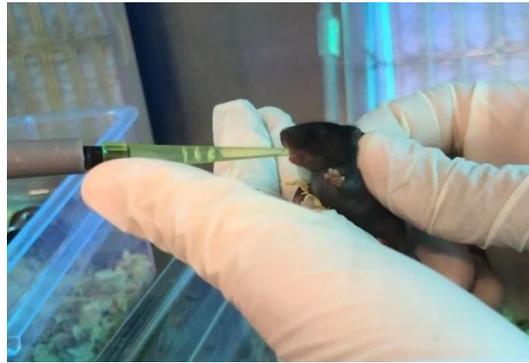
**Grupo 2 *PBS e Inulina (G2)*** - Filhotes machos de progenitoras tratadas via intraperitoneal com PBS em E16, receberam 50 uL de inulina a 10% em P3 a P21 (n=4);

**Grupo 3 *STAg e H2O (G3)*** - Filhotes mschos de progenitoras tratadas via intraperitoneal com STAg em E16, receberam água destilada em P3 a P21 (n=6);

**Grupo 4 *STAg e Inulina (G4)*** - Filhotes machos de progenitoras tratadas via intraperitoneal com STAg em E16, receberam 50 uL de inulina a 10%, de P3 a P21, (n=6).

As gavagens foram feitas usando-se uma pipeta com ponteira pequena, introduzida gentilmente diretamente na boca do animal (figura 11), por serem esses muito pequenos para se usar a agulha de gavagem.

Após o período de tratamento dos filhotes (P3 a P21) eles foram mantidos em gaiolas com no máximo 5 animais, até atingirem a idade de P60, quando então foram feitos os testes comportamentais.



**Figura 11: Filhotes sendo tratados via oral utilizando pipeta. Fonte: Autores, 2023**

### **4.3 Imunoativação maternal com antígenos solúveis de *Toxoplasma***

As progenitoras foram desafiadas imunologicamente usando-se antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg) em uma concentração de 25µg/100µL, em uma injeção única (volume de 100 ul) por animal, via intraperitoneal em E16. O STAg foi fornecido pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

### **4.4 Inulina**

Os animais (filhotes fêmeas e machos) foram tratados com 50 µL de inulina (EVOVA) a 10% (água destilada como veículo) do 3° a 21° dia pós-nascimento. A inulina foi fornecida pela Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro (FIOCRUZ-RJ).

### **4.5 Teste comportamental Labirinto em cruz Elevado (LCE)**

É um teste comportamental baseado no comportamento de “conflito de aproximação-esquiva”, em que o animal precisa decidir entre explorar um ambiente aversivo ou permanecer protegido. O teste tem como finalidade analisar desordens de pânico e ansiedade, baseados nos parâmetros descritos na literatura, dentre eles: Tempo gasto nos braços abertos e fechados, porcentagem de tempo gasto nos braços abertos, número de entrada em cada braço (aberto e fechado), head-deeping (mergulho, olhar para baixo), stretchedattendpostures (extensão do corpo saindo da posição posterior para anterior, o animal fica com o corpo esticado sendo possível observar principalmente as patas traseiras, sem o seu deslocamento), grooming (autolimpeza), rearing (levanta o corpo com o apoio nas patas traseiras) (figura 12). O aparato para realização do teste consiste em uma cruz, composta por dois braços abertos e dois fechados, elevados do solo (figura 13). Normalmente o material do aparato é feito de madeira revestida com tinta óleo (ou em outros materiais acrílico, plástico e perspex), possui

50 cm em relação ao chão da sala, com braços abertos de dimensões de 25 x 5 x 0,5 cm, os braços abertos ficam de lados opostos um do outro e não há bordas ou paredes delimitando suas extremidades. Os braços fechados possuem dimensões de 25 x 5 x 16 cm, com paredes de 15 cm de altura. O animal é inserido no centro do aparato e é deixado para explorar o local por cinco minutos, sem interferências, contando apenas com o auxílio de uma câmera para gravação do comportamento do animal. A partir da gravação são analisados os parâmetros comportamentais citados acima. A diminuição da exploração dos braços abertos, maior permanência nos braços fechados e aumento de avaliação de risco nos ambientes protegidos do aparato, denota comportamento do tipo ansiosos (Oliveira et al., 2022; Bocca et al., 2012).



**Figura 12: Dois dos parâmetros possíveis de visualizar e utilizados para avaliação do teste LCE: Head-deeping; 2- Stretchedattendpostures. Fonte: Autores, 2023**



**Figura 13: Aparato para realização do teste Labirinto em Cruz Elevado. Fonte: Autores 2023.**

#### **4.6 Destino dos animais após os experimentos**

Utilizou-se cetamina 80mg/Kg e xilazina 10mg/Kg acompanhado do deslocamento cervical para realização da eutanásia de todos os animais (progenitoras, machos e filhotes). As

progenitoras (que receberam STAg ou PBS) foram eutanasiadas após o desmame dos filhotes (dia 21) a fim de prevenir qualquer dano ou sofrimento desnecessário, juntamente com os machos utilizados no acasalamento. A prole foi eutanasiada após a realização do teste comportamental. As carcaças foram acondicionadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de descarte definitivo, no REBIR-UFU, conforme rotina da rede de biotérios.

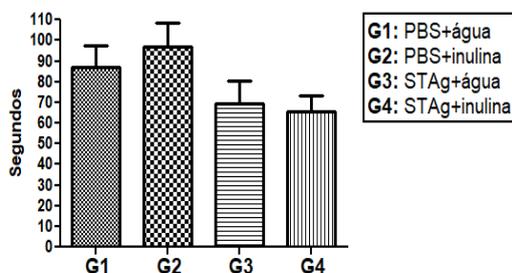
#### 4.7 Análise Estatística

Os resultados dos testes comportamentais foram analisados por ANOVA one-way no programa Prism 5, sendo os dados expressos como média e EPM. Alterações significativas foram consideradas com  $p < 0,05$  e quando ANOVA indicou diferenças significativas à análise deu-se continuidade à análise pelo teste post hoc de Student-Newman-Keuls (SNK) para comparação entre os grupos de interesse.

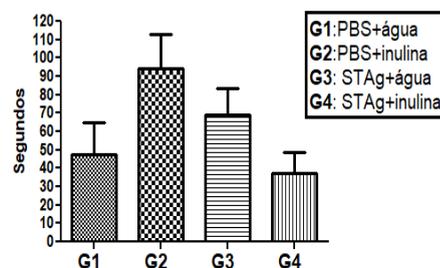
### 5. RESULTADOS

Um dos parâmetros avaliados pelo teste de labirinto em cruz elevado é o tempo de exploração dos animais nos braços abertos do aparato. Embora as fêmeas do grupo G2 (PBS+inulina) tenham passado mais tempo explorando os braços abertos que os demais grupos, a diferença não foi significativa ( $P > 0,05$ ) (fig.14). O mesmo pode ser observado para os machos do grupo G2, que também exploraram mais os braços abertos (fig.15), demonstrando uma “tendência” da inulina em diminuir comportamentos do tipo ansiosos embora a diferença não tenha sido significativa ( $P > 0,05$ ). Em ambos os sexos (machos e fêmeas), percebe-se também que o STAg diminuiu o tempo de exploração dos braços abertos, indicando uma tendência de efeito ansiogênico, embora as diferenças também não tenham sido significativas ( $P > 0,05$ ).

Tempo gasto nos braços abertos (fêmeas)



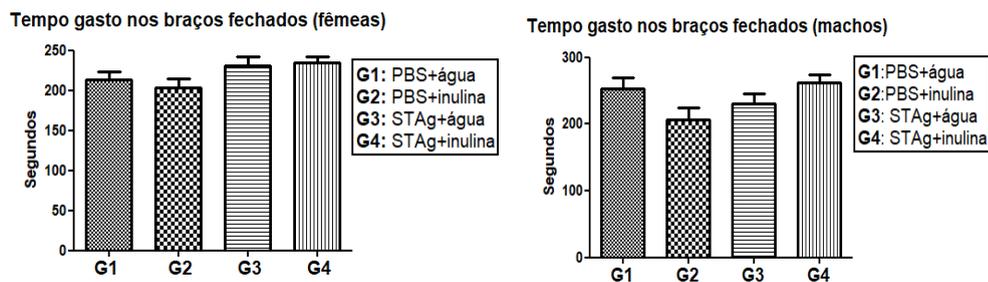
Tempo gasto nos braços abertos (machos)



**Figuras 14 e 15.** Tempo nos braços abertos do aparato pelos animais dos quatro grupos e separados por sexo (fêmeas e machos) no teste de LCE. Fêmeas G1(86,9±12,03), G2(96,8±12,48), G3(69,2±10,64), G4(65,5±7,90).

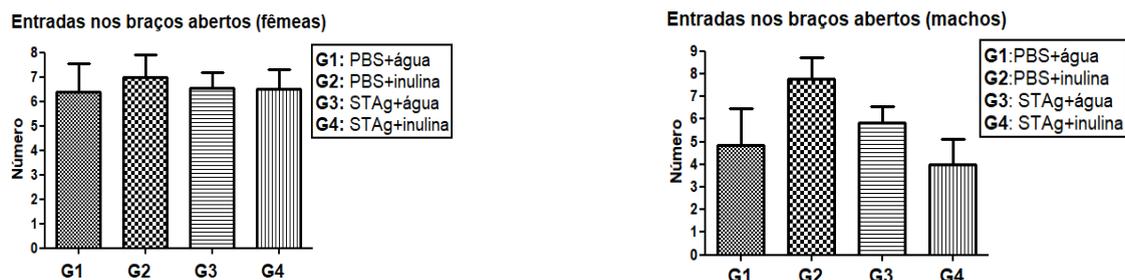
Machos G1(47,3±0,04), G2(94,5±0,63), G3(69,1±0,57), G4(37,3±0,91). Não houve diferença significativa entre os grupos de nenhum dos sexos. Diferença estatística significativa considerada se  $p < 0,05$ . Os dados foram apresentados na forma de média  $\pm$  EPM.

Em relação ao tempo gasto nos braços fechados, embora as fêmeas cuja mães foram tratadas com STAg tenham passado mais tempo explorando esse lado do aparato, um efeito considerado ansiogênico, a diferença não foi significativa ( $P > 0,05$ ) (fig.16). Para o grupo dos machos (fig.17), observa-se que o tratamento com inulina (animais G2), diminuiu a exploração dos braços fechados, indicando uma “tendência” de efeito ansiolítico, porém sem diferença significativa entre os grupos ( $P > 0,05$ ).



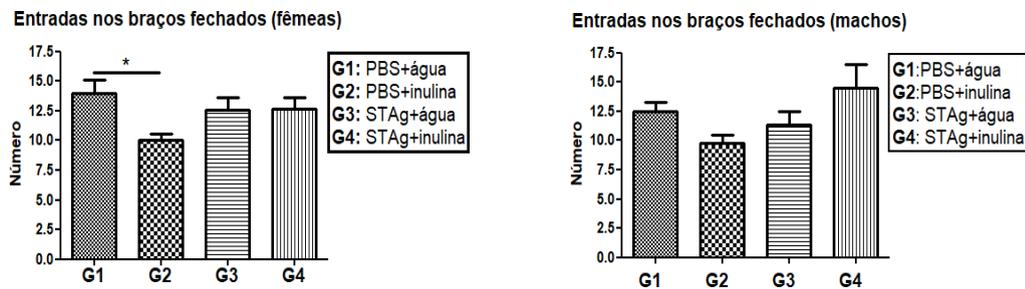
**Figuras 16 e 17.** Tempo gasto nos braços fechados do aparato pelos animais dos quatro grupos separados por sexo (fêmeas e machos) no teste LCE. Fêmeas G1(213,1±12,03), G2(203,2±12,48), G3(230,7±10,64), G4(234,5±7,90). Machos G1(252,66±0,04), G2(206±0,63), G3(230,83±0,57), G4(262,66±0,91). Não houve diferença significativa entre os grupos de nenhum dos sexos. Diferença estatística significativa considerada se  $p < 0,05$ . Os dados foram apresentados na forma de média  $\pm$  EPM.

As figuras 18 e 19 representam número de entradas nos braços abertos do aparato, para fêmeas e machos, respectivamente. Para as fêmeas não houve diferença significativa entre os grupos ( $P > 0,05$ ), assim como para os machos ( $P > 0,05$ ), embora observe-se que os animais cuja mães receberam apenas PBS e os filhotes foram tratados com inulina tenham exibido um maior número de entradas nos braços abertos em relação aos demais grupos, denotando novamente uma “tendência” de efeito ansiolítico da inulina.



**Figuras 18 e 19.** Entradas nos braços abertos do aparato pelos animais dos quatro grupos separados por sexo (fêmeas e machos) no teste LCE. Fêmeas G1(6,4±12,03), G2(7±12,48), G3(6,5±10,64) G4(6,5±7,90). Machos G1(4,8±0,04), G2(7,7±0,63), G3(5,8±0,57), G4(4±0,91). Não houve diferença significativa entre os grupos de nenhum dos sexos. Diferença estatística significativa considerada se  $p < 0,05$ . Os dados foram apresentados na forma de média ± EPM.

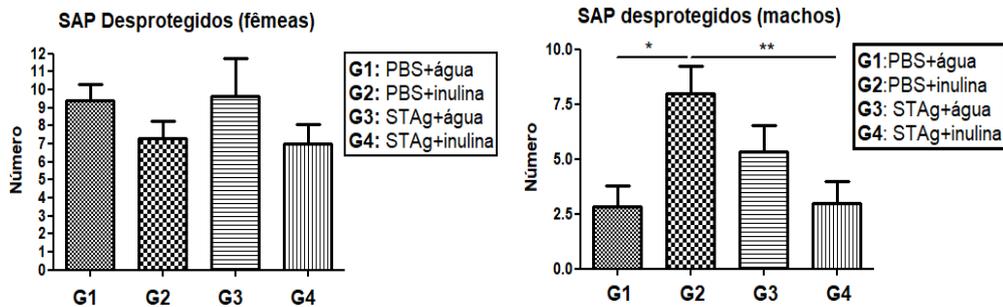
Em relação ao parâmetro número de entradas nos braços fechados, encontrou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ), para as fêmeas (fig.20), entre os grupos G1 (PBS+água) e G2 (PBS + inulina), sendo que os animais do grupo G2 entraram menos vezes nos braços fechados ( $10 \pm 12,48$ ) em comparação ao G1 ( $14 \pm 12,03$ ), denotando um efeito ansiolítico da inulina, confirmado pelo Pós-teste de Newman-Keuls. Entretanto, o mesmo efeito não foi observado para os machos, em termos de significância ( $p > 0,05$ ), embora os animais do grupo G2 também tenham entrado menos vezes nos braços fechados.



**Figuras 20 e 21.** Entradas nos braços fechados do aparato pelos animais, os quatro grupos separados por sexo (fêmeas e machos) no teste LCE. Fêmeas G1(14±12,03), G2(10±12,48), G3(12,5±10,64), G4(12,7±7,90). Machos G1(12,5±0,04), G2(9,75±0,63), G3(11,33±0,57), G4(14,5±0,91). Não houve diferença significativa no grupo dos machos. Nas fêmeas houve diferença significativa entre G1(14±12,03) e G2(10 ±12,48). Diferença estatística significativa considerada se  $p < 0,05$ . Os dados foram apresentados na forma de média ± EPM.

Outro parâmetro analisado foi o número de stretchtendposture(SAP) desprotegidos, em que o animal realiza comportamento de avaliação de risco em ambiente desprotegido (braços abertos). Em relação a prole feminina (fig.22) não houve diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Para os machos (fig.23) houve diferença significativa entre os grupos G1 e G2, sendo que os animais que receberam inulina fizeram mais avaliação de risco em ambiente desprotegido (G2-  $8 \pm 0,63$ ) que os animais que receberam água (G1-  $2,8 \pm 0,04$ ), demonstrando um efeito ansiolítico da inulina. Também observou-se diferença significativa entre os grupos G2 e G4, sendo que os animais cujas mães foram desafiadas com STAg e os filhotes tratados com inulina diminuíram o número de SAP desprotegidos (G4-  $3 \pm 0,91$ ) em relação ao grupo cujas mães não foram desafiadas e os filhotes receberam inulina (G2-  $8 \pm 0,63$ ), demonstrando

novamente um efeito ansiolítico da inulina. Por essa análise pode-se ver também que embora a inulina sozinha tenha sido benéfica (grupo G2), ela não conseguiu reverter os efeitos ansiogênicos do STAg (grupo G4).



**Figuras 22 e 23.** SAP desprotegidos do aparato para os animais dos quatro grupos separados por sexo (fêmeas e machos) no teste LCE. Fêmeas G1(9,4±12,03), G2(7,3±12,48), G3(9,6±10,64), G4(7±7,90). Não houve diferença significativa no grupo das fêmeas. Houve diferença significativa no grupo dos machos G1(2,8±0,04), G2(8±0,63), G3(5,3±0,57), G4(3±0,91). Diferença estatística significativa considerada se  $p < 0,05$ . Os dados foram apresentados na forma de média ± EPM.

## 7. DISCUSSÃO

No presente estudo buscamos analisar os possíveis efeitos do insulto imunogênico na prole adulta de camundongos C57BL/6 oriundos de mães desafiadas imunologicamente, utilizando antígenos suspensos de *Toxoplasma gondii* (STAg) na idade gestacional E16. Bem como, um possível efeito neuroprotetor da inulina, avaliado pelo teste comportamental Labirinto em Cruz Elevado.

Uma vez que fêmeas apresentam ciclo estral, podendo variar seu comportamento conforme os níveis de hormônios se modificam, resolvemos testar machos e fêmeas, embora não tenhamos feito o estadiamento do ciclo estral.

O teste labirinto em cruz é considerado um dos testes mais utilizados para avaliar o medo e ansiedade. O teste existe há mais de 50 anos, desde sua criação passou por várias alterações a fim de criar padronização e melhor entendimento para que então pudesse ser utilizado efetivamente. O teste consiste em submeter o animal a um conflito de aproximação- esquiva, uma vez que ao ser colocado para explorar o aparato, ele deve decidir entre ficar no ambiente mais protegido (braços fechados) ou se arriscar e explorar também as áreas mais desprotegidas (braços abertos). A altura do aparato também oferece um desafio ao animal. Neste contexto, alguns parâmetros servem como indicadores de comportamento do tipo ansioso, como menor tempo de exploração dos braços abertos, maior tempo de exploração e entradas nos

braços fechados, diminuição de comportamentos de avaliação de risco em locais do aparato considerados aversivos ao animal.

Sabemos que o desafio imunogênico materno durante a gestação, por diferentes vias (infecção por vírus, bactérias, protozoários, ou apenas o contato da mãe com seus antígenos, mesmo sem a doença) leva a alterações no neurodesenvolvimento (Meyer et al., 2007) e assim predispõe a prole ao surgimento de transtornos psiquiátricos na vida adulta, dentre eles a ansiedade (Quagliato et al., 2021).

Em nossos experimentos desafiamos as mães com antígenos solúveis de *Toxoplasma* na idade gestacional E16. Diferentes estudos tem buscado esclarecer em qual idade gestacional o insulto imunogênico seria mais significativo, embora ainda não haja uma resposta conclusiva, dada a complexidade de fatores envolvidos no neurodesenvolvimento (Knuesel et al., 2014). Spini e colaboradores (2020) encontraram comportamentos do tipo ansiosos e depressivos, avaliados em testes como labirinto em cruz elevado e nado forçado, dentre outros, em filhos de mães desafiadas com STAg e antígenos suspensos na vacina influenza, em duas idades gestacionais, E6 e E16.

Nossos resultados mostraram uma “tendência” do desafio imunogênico com STAg em gerar comportamentos do tipo ansiosos, quando analisamos diferentes parâmetros do teste LCE. Embora as diferenças não tenham sido significativas na prole fêmea cujas mães foram desafiadas com STAg, grupos G3 e G4, observou-se menor tempo de exploração dos braços abertos e aumento do tempo nos braços fechados, comportamentos estes associados a um maior nível de ansiedade. Já na prole constituída por machos, o desafio gestacional com STAg diminuiu significativamente o número de um tipo de comportamento de avaliação de risco (stretch-attend posture) em área desprotegida, no grupo G4 em relação ao G2, denotando um efeito ansiogênico do mesmo.

Sabemos que a microbiota intestinal sofre alterações de sua composição, em termos de quantidade e diversidade, ao longo da vida, parecendo haver “janelas temporais” em que essas mudanças podem conferir mais saúde ao hospedeiro ou predispor ao surgimento de doenças (Borre et al., 2014). Neste sentido, diferentes estudos tem buscado entender o papel da microbiota em diferentes fases da vida (Zou et al., 2024; Roberfroid et al., 2010). Guo e colaboradores (2021) demonstrou em seus estudos que a inulina foi capaz de modular a microbiota intestinal, trazendo melhoras na neuroinflamação e esquizofrenia. Nesse estudo foi utilizado camundongos machos C57BL/6J, os animais foram submetidos à várias análises dentre eles, o teste comportamental como de campo aberto, imuno-histoquímica e outros métodos.

Uma das hipóteses do nosso trabalho era que a inulina, um carboidrato conhecido no meio científico por sua ação prebiótica (modulando de forma positiva a microbiota intestinal), se administrada durante a fase de lactação poderia conferir proteção à prole das mães desafiadas durante a gestação, diminuindo os comportamentos do tipo ansiosos, uma vez que já está clara a forte relação entre o intestino, a microbiota e o cérebro (Silva et al., 2020; Hao et al., 2020; Wenqiang et al., 2021), bem como a importância do estabelecimento da microbiota na primeira infância (Penders et al., 2006).

Embora em nossos experimentos diferenças significativas relacionadas ao tratamento com inulina só tenham sido observadas quanto ao parâmetro stretch-attend posture em ambiente desprotegido, em que vimos aumento desse tipo de comportamento no grupo G2 quando comparado ao G1 (prole fêmea), pudemos observar uma “tendência” de ação ansiolítica da inulina quando avaliados outros parâmetros. Por exemplo nos machos, a inulina (grupo G2) aumentou o tempo de exploração nos braços abertos, reduziu o tempo nos braços fechados e aumentou o número de entradas nos braços abertos. Nas fêmeas a inulina diminuiu o número de entradas nos braços fechados.

Os animais desse experimento passaram por outros testes comportamentais além do labirinto em cruz elevado. Nos testes spray de sacarose e enterramento de bolinhas, que buscam investigar comportamentos do tipo depressivos e compulsivos, respectivamente, foi observado efeito protetor da inulina (dados não publicados), quando comparados aos grupos não tratados. Os resultados de todos os testes, quando reunidos, poderão nos auxiliar no entendimento do papel da inulina sobre a microbiota e possível proteção contra transtornos de humor.

Diferentes fatores podem ter contribuído para que não obtivéssemos diferença significativa entre os grupos estudados, a despeito dos resultados já obtidos por outros pesquisadores. Ajustes na concentração de STAg e inulina, padronização nos horários de administração tanto do desafio imunogênico quanto do tratamento com inulina, bem como a manutenção das condições do ambiente onde os animais são criados e testados, ao longo de todo o experimento, podem ser necessários.

## 8. CONCLUSÃO

Podemos concluir, através de nossos resultados, que o desafio imunogênico de fêmeas C57 com STAg em E16, reduziu o número de avaliação de risco em ambiente desprotegido (SAP desprotegido) no teste LCE, do grupo G2 em relação ao G1, demonstrando efeito ansiogênico. A inulina administrada via oral aos filhotes fêmeas na fase de lactação (G2)

diminuiu a entrada nos braços fechados do aparato, quando comparado ao grupo G1, demonstrando efeito ansiolítico, provavelmente por modulação da microbiota. Os resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa em outros testes comportamentais, quando tomados em conjunto, poderão ajudar a esclarecer o real papel da inulina no contexto da modulação da microbiota e proteção do SNC contra transtornos psiquiátricos.

## 9. REFERÊNCIAS

ALLEN, Andrew P. et al. A Psychology of the Human Brain-Gut Microbiome Axis. *Social and Personality Psychology Compass*, vol. 11, no. 4, Apr. 2017, p. e12309. Disponível em: [onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/spc3.12309](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/spc3.12309). Acesso em: 27 Abr. 2019.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. DSM-5 ®.

BEAR, Mark F. **Neurociências** . 4ª edição. Porto Alegre: ArtMed, 2017. *E-book*. pág.759-761. ISBN9788582714331. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788582714331/>. Acesso em: 13 nov. 2024.

Berding, Kirsten, et al. “Diet and the Microbiota–Gut–Brain Axis: Sowing the Seeds of Good Mental Health.” *Advances in Nutrition*, vol. 12, no. 4, 9 Mar. 2021, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8321864/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8321864/), <https://doi.org/10.1093/advances/nmaa18>.

Bergdolt, Lara, and Anna Dunaevsky. “Brain Changes in a Maternal Immune Activation Model of Neurodevelopmental Brain Disorders.” *Progress in Neurobiology*, vol. 175, Apr. 2019, pp. 1–19, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.12.002>.

Bocca, Wladimir, et al. *TESTE de LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO: APLICAÇÕES E CONTRIBUIÇÕES NO ESTUDO de DOENÇAS NEUROPSIQUIÁTRICAS EM MODELOS ANIMAIS*. 2012.

Borre, Yuliya E., et al. “Microbiota and Neurodevelopmental Windows: Implications for Brain Disorders.” *Trends in Molecular Medicine*, vol. 20, no. 9, Sept. 2014, pp. 509–518, [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471491414000811](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471491414000811), <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.05.002>.

Breit, Sigrid, et al. "Vagus Nerve as Modulator of the Brain–Gut Axis in Psychiatric and Inflammatory Disorders." *Frontiers in Psychiatry*, vol. 9, no. 44, 13 Mar. 2018, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5859128/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5859128/), <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2018.00044>.

CARABOTTI, Marilia et al. The Gut-Brain Axis: Interactions between Enteric Microbiota, Central and Enteric Nervous Systems. *Annals of Gastroenterology*, vol. 28, no. 2, 2015, pp. 203–209.

CENIT, María Carmen et al. Influence of Gut Microbiota on Neuropsychiatric Disorders. *World Journal of Gastroenterology*, vol. 23, no. 30, 2017, p. 5486.

Christian, Lisa M., et al. "Gut Microbiome Composition Is Associated with Temperament during Early Childhood." *Brain, Behavior, and Immunity*, vol. 45, 1 Mar. 2015, pp. 118–127, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4342262/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4342262/), <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.10.018>. Accessed 2 Mar. 2020.

Dinan, Timothy G., and John F. Cryan. "The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease." *Gastroenterology Clinics of North America*, vol. 46, no. 1, Mar. 2017, pp. 77–89, <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2016.09.007>. Accessed 19 Nov. 2019.

Divyashri G, Sadanandan B, Chidambara Murthy KN, Shetty K, Mamta K. Potencial neuroprotetor de oligossacarídeos não digeríveis: uma visão geral das evidências experimentais. *Fronteiras da Farmacologia*. 2021; 12:712531. DOI: 10.3389/fphar.2021.712531. PMID: 34497516; PMCID: PMC8419344.

Estes, M. L., and A. K. McAllister. "Maternal Immune Activation: Implications for Neuropsychiatric Disorders." *Science*, vol. 353, no. 6301, 18 Aug. 2016, pp. 772–777, <https://doi.org/10.1126/science.aag3194>. Accessed 25 Jan. 2021.

FERREIRA, Frederico R. et al. "O Universo Paralelo Que Nos Habita." 1° ed., Rio de Janeiro, 2023, p. 169.

FLOWERS, Stephanie A. et al. The Gut Microbiome in Bipolar Disorder and Pharmacotherapy Management. *Neuropsychobiology*, vol. 79, no. 1, 2020, pp. 43–49.

Foster, Jane A., and Karen-Anne McVey Neufeld. "Gut–Brain Axis: How the Microbiome Influences Anxiety and Depression." *Trends in Neurosciences*, vol. 36, no. 5, May 2013, pp. 305–312.

Fülling, Christine, et al. "Gut Microbe to Brain Signaling: What Happens in Vagus...." *Neuron*, vol. 101, no. 6, Mar. 2019, pp. 998–1002, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.02.008>. Accessed 23 July 2019.

GUIMARÃES, Ana Margarida Voss et al. Transtornos de Ansiedade: Um Estudo de Prevalência sobre as Fobias Específicas e a Importância da Ajuda Psicológica. *Caderno de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde - UNIT - ALAGOAS*, vol. 3, no. 1, 30 Nov. 2015, pp. 115–128.

Gumusoglu, Serena B., et al. "The Role of IL-6 in Neurodevelopment after Prenatal Stress." *Brain, Behavior, and Immunity*, vol. 65, Oct. 2017, pp. 274–283, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.05.015>. Accessed 10 May 2022.

Guo, Li, et al. "Inulin Ameliorates Schizophrenia via Modulation of the Gut Microbiota and Anti-Inflammation in Mice." *Food & Function*, vol. 12, no. 3, 15 Feb. 2021, pp. 1156–1175, [pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/FO/D0FO02778B](https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/FO/D0FO02778B), <https://doi.org/10.1039/D0FO02778B>.

Hall Mary Beth, et al. "Maternal Immune Activation as an Epidemiological Risk Factor for Neurodevelopmental Disorders: Considerations of Timing, Severity, Individual Differences, and Sex in Human and Rodent Studies." *Frontiers in Neuroscience*, vol. 17, 13 Apr. 2023, <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1135559>. Accessed 15 Oct. 2023.

Han, Velda X., et al. "Maternal Immune Activation and Neuroinflammation in Human Neurodevelopmental Disorders." *Nature Reviews Neurology*, vol. 17, no. 9, 2 Aug. 2021, pp. 564–579, <https://doi.org/10.1038/s41582-021-00530-8>.

Hannibal, K. E., and M. D. Bishop. "Chronic Stress, Cortisol Dysfunction, and Pain: A Psychoneuroendocrine Rationale for Stress Management in Pain Rehabilitation." *Physical*

Therapy, vol. 94, no. 12, 17 July 2014, pp. 1816–1825, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4263906/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4263906/), <https://doi.org/10.2522/ptj.20130597>.

<https://doi.org/10.1016/j.it.2022.01.007>. Accessed 8 Mar. 2022.

<https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i30.5486>. Acesso em: 12 Dez. 2019.

Hao, Li et al. “Effects of Dietary Inulin during Late Gestation on Sow Physiology, Farrowing Duration and Piglet Performance.” *Animal Reproduction Science*, vol. 219, Aug. 2020, p. 106531, <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106531>. Accessed 18 Mar. 2021.

Huang, Fei, and Xiaojun Wu. “Brain Neurotransmitter Modulation by Gut Microbiota in Anxiety and Depression.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 9, 11 Mar. 2021, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7991717/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7991717/), <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.649103>. Accessed 15 May 2021.

IHEKWEAZU, Faith D. and VERSALOVIC, James. Development of the Pediatric Gut Microbiome: Impact on Health and Disease. *The American Journal of the Medical Sciences*, vol. 356, no. 5, Nov. 2018, pp. 413–423.

Joca, Sâmia Regiane Lourenço, et al. “Modulation of Stress Consequences by Hippocampal Monoaminergic, Glutamatergic and Nitrergic Neurotransmitter Systems.” *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, vol. 10, no. 3, 1 Aug. 2007, pp. 227–249, [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17613938/](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17613938/), <https://doi.org/10.1080/1025389070122313>.

Knuesel, Irene, et al. “Maternal Immune Activation and Abnormal Brain Development across CNS Disorders.” *Nature Reviews Neurology*, vol. 10, no. 11, 14 Oct. 2014, pp. 643–660, [www.nature.com/articles/nrneurol.2014.187](http://www.nature.com/articles/nrneurol.2014.187), <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.187>.

Koblinsky, Noah, et al. The Role of the Gut Microbiome in Diet and Exercise Effects on Cognition: A Review of the Intervention Literature. Vol. 78, no. 2, 17 Aug. 2022, pp. 195–205, <https://doi.org/10.1093/gerona/glac166>.

Krishna, Gokul, and Muralidhara. “Inulin Supplementation during Gestation Mitigates Acrylamide-Induced Maternal and Fetal Brain Oxidative Dysfunctions and Neurotoxicity in

Rats.” *Neurotoxicology and Teratology*, vol. 49, May 2015, pp. 49–58, <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2015.03.003>. Accessed 7 July 2019.

Kwon, Ho-Keun, et al. “Maternal Inflammation and Its Ramifications on Fetal Labetoulle, Marc, et al. “How Gut Microbiota May Impact Ocular Surface Homeostasis and Related Disorders.” *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 100, 8 Mar. 2024, pp. 101250–101250, [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350946224000156](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350946224000156), <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2024.101250>. Accessed 14 Oct. 2024.

Majerczyk, Daniel, et al. “Systemic Maternal Inflammation Promotes ASD via IL-6 and IFN- $\gamma$ .” *Bioscience Reports*, vol. 42, no. 11, Nov. 2022.

Manti, Sara, et al. “Impact of Respiratory Viral Infections during Pregnancy on the Neurological Outcomes of the Newborn: Current Knowledge.” *Frontiers in Neuroscience*, vol. 17, 2023, p. 1320319, [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38260010/](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38260010/), <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1320319>. Accessed 12 Feb. 2024.

Margis, Regina, et al. “Relação Entre Estressores, Estresse E Ansiedade.” *Revista de Psiquiatria Do Rio Grande Do Sul*, vol. 25, 2003, pp. 65–74.

Margolis, Kara G., et al. “The Microbiota-Gut-Brain Axis: From Motility to Mood.” *Gastroenterology*, vol. 160, no. 5, Jan. 2021, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.10.066>.

Marques-Deak, Andrea, and Esther Sternberg. “Psiconeuroimunologia: A Relação Entre O Sistema Nervoso Central E O Sistema Imunológico.” *Revista Brasileira de Psiquiatria*, vol. 26, no. 3, Sept. 2004, pp. 143–144, <https://doi.org/10.1590/s1516-44462004000300002>.

Massarali, Aïcha, et al. “Virus-Induced Maternal Immune Activation as an Environmental Factor in the Etiology of Autism and Schizophrenia.” *Frontiers in Neuroscience*, vol. 16, 12 Apr. 2022, <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.834058>. Accessed 20 May 2022.

Mastenbroek L. J. M., et al. “The Role of Microglia in Early Neurodevelopment and the Effects of Maternal Immune Activation.” *Seminars in Immunopathology*, vol. 46, no. 1-2, 1 July 2024,

pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11239780/, <https://doi.org/10.1007/s00281-024-01017-6>. Accessed 24 Oct. 2024.

Mawson, Anthony R., and Ashley M. Croft. “Rubella Virus Infection, the Congenital Rubella Syndrome, and the Link to Autism.” *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 16, no. 19, 1 Oct. 2019, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6801530/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6801530/), <https://doi.org/10.3390/ijerph16193543>.

Meyer, Urs, et al. “The Neurodevelopmental Impact of Prenatal Infections at Different Times of Pregnancy: The Earlier the Worse?” *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, vol. 13, no. 3, 1 June 2007, pp. 241–256, [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17519367/](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17519367/), <https://doi.org/10.1177/1073858406296401>.

Milani, Christian, et al. “The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 81, no. 4, 8 Nov. 2017, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5706746/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5706746/), <https://doi.org/10.1128/mnbr.00036-17>.

Mishra, Manoj Kumar, et al. “Understanding the Molecular Mechanism of Blood–Brain Barrier Damage in an Experimental Model of Japanese Encephalitis: Correlation with Minocycline Administration as a Therapeutic Agent.” *Neurochemistry International*, vol. 55, no. 8, Dec. 2009, pp. 717–723, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.07.006>. Accessed 26 Oct. 2022.

Morais, Mauro Batista de, and Cristina Miuki Abe Jacob. “The Role of Probiotics and Morato, Silvio. “O Papel Da Visão Na Aversão Aos Espaços Abertos No Labirinto Em Cruz Elevado.” *Psicologia USP*, vol. 17, 2006, pp. 159–174.

Murphy K. *Immunobiology of Jeneway*. 8 ed. Washington University School of medicine, St. Louis 2016.

Naufel Maria Fernanda, et al. “The Brain-Gut-Microbiota Axis in the Treatment of Neurologic and Psychiatric Disorders.” *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, vol. 81, no. 07, 1 July 2023, pp. 670–684, <https://doi.org/10.1055/s-0043-1767818>.

Neurodevelopment.” *Trends in Immunology*, vol. 43, no. 3, Mar. 2022, pp. 230–244,  
Oliveira, Iran Johnathan Silva, et al. “Ansiedade Em Ratos Submetidos à Restrição de Espaço  
No Labirinto Em Cruz Elevado”: *AMAZÔNIA: SCIENCE & HEALTH*, vol. 10, no. 4, 1 Dec.  
2022, pp. 55–66.

“OMS Destaca Necessidade Urgente de Transformar Saúde Mental E Atenção - OPAS/OMS |  
Organização Pan-Americana Da Saúde.”

Penders, John, et al. “Factors Influencing the Composition of the Intestinal Microbiota in Early  
Infancy.” *Pediatrics*, vol. 118, no. 2, 2006, pp. 511–21,  
[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16882802](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16882802), <https://doi.org/10.1542/peds.2005-2824>.

Pereira, Priscila Krauss, and Giovanni Marcos Lovisi. “Prevalência Da Depressão Gestacional  
E Fatores Associados.” *Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)*, vol. 35, no. 4, 2008, pp.  
144–153, <https://doi.org/10.1590/s0101-60832008000400004>.

Prebiotics in Pediatric Practice.” *Jornal de Pediatria*, vol. 82, no. 8, 6 Nov. 2006, pp. 189–  
Quagliato, Laiana A., et al. “Maternal Immune Activation Generates Anxiety in Offspring: A  
Translational Meta-Analysis.” *Translational Psychiatry*, vol. 11, no. 1, 26 Apr. 2021,  
<https://doi.org/10.1038/s41398-021-01361-3>. Accessed 11 May 2021.

Rios, Adiel C., et al. “Microbiota Abnormalities and the Therapeutic Potential of Probiotics in  
the Treatment of Mood Disorders.” *Reviews in the Neurosciences*, vol. 28, no. 7, 1 Jan. 2017,  
<https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0001>

Roberfroid, Marcel, et al. “Prebiotic Effects: Metabolic and Health Benefits.” *British Journal  
of Nutrition*, vol. 104, no. S2, Aug. 2010, pp. S1–S63,  
<https://doi.org/10.1017/s0007114510003363>.

Sajdel-Sulkowska, Elizabeth M. “The Impact of Maternal Gut Microbiota during Pregnancy on  
Fetal Gut–Brain Axis Development and Life-Long Health Outcomes.” *Microorganisms*, vol.  
11, no. 9, 31 Aug. 2023, pp. 2199–2199, <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092199>.  
Accessed 6 Nov. 2023.

Santos, José Natanael Gama dos, et al. “Internações Por Transtornos Mentais E Comportamentais, Região Norte, Brasil, de 2017 a 2021.” *Research, Society and Development*, vol. 11, no. 10, 1 Aug. 2022, p. e300111030593.

Sharon, Gil, et al. “The Central Nervous System and the Gut Microbiome.” *Cell*, vol. 167, no. 4, Nov. 2016, pp. 915–932, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.027>.

Sheng, Wei, et al. “Immunomodulatory Effects of Inulin and Its Intestinal Metabolites.” *Frontiers in Immunology*, vol. 14, 2023, p. 1224092, [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37638034/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37638034/), <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1224092>.

Silva, Ygor Parladore, et al. “The Role of Short-Chain Fatty Acids from Gut Microbiota in Gut-Brain Communication.” *Frontiers in Endocrinology*, vol. 11, no. 25, 31 Jan. 2020, <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025>.

Sousa, Maria Bernardete Cordeiro de, et al. “Resposta Ao Estresse: I. Homeostase E Teoria Da Alostase.” *Estudos de Psicologia*, vol. 20, no. 1, 2015, pp. 1–10, [www.scielo.br/pdf/epsic/v20n1/1413-294X-epsic-20-01-0002.pdf](http://www.scielo.br/pdf/epsic/v20n1/1413-294X-epsic-20-01-0002.pdf), <https://doi.org/10.5935/1678-4669.20150002>.

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*, vol. 80, no. 3, 16 Oct. 2020, pp. 234–241, <https://doi.org/10.1159/000510791>.

Strandwitz, Philip. “Neurotransmitter Modulation by the Gut Microbiota.” *Brain Research*, vol. 1693, no. Pt B, 2018, pp. 128–133, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.015>.

Tawfick, Mahmoud M., et al. “Inulin Fructans in Diet: Role in Gut Homeostasis, Immunity, Health Outcomes and Potential Therapeutics.” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 208, May 2022, pp. 948–961, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.218>.

Tian, Min, et al. Maternal Microbe-Specific Modulation of the Offspring Microbiome and Development during Pregnancy and Lactation. Vol. 15, no. 1, 15 May 2023, pp. 2206505–2206505, <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2206505>. Accessed 28 May

“Transtornos Mentais-OPAS/OMS|Organização Pan-AmericanaDa Saúde.” 197, <https://doi.org/10.2223/jped.1559.2023>.

Vedovato, Kleber, et al. “O EIXO INTESTINO-CÉREBRO E O PAPEL DA SEROTONINA.” Arquivos de Ciências Da Saúde Da UNIPAR, vol. 18, no. 1, 9 July 2015, <https://doi.org/10.25110/arqsaude.v18i1.2014.5156>. Accessed 4 Nov. 2024.

Wenqiang, Li, et al. “Maternal Immune Activation Alters Adult Behavior, Intestinal Integrity, Gut Microbiota and the Gut Inflammation.” *Brain and Behavior*, vol. 11, no. 5, Apr. 2021, <https://doi.org/10.1002/brb3.2133>.

Wolterink Klein, Roel G.J., et al. “Neuroimmune Interactions in Peripheral Organs.” *Annual Review of Neuroscience*, vol. 45, no. 1, 8 July 2022, pp. 339–360, <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-111020-105359>.

World Health Organization “World mental health report: Transforming mental health for all”, junho,2022, p.272.

World Health Organization. “Mental Disorders.” World Health Organization, 8 June 2022, [www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mental-disorders](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mental-disorders).

Zou, Hui, et al. “Dietary Inulin Alleviated Constipation Induced Depression and Anxiety-like Behaviors: Involvement of Gut Microbiota and Microbial Metabolite Short-Chain Fatty Acid.” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 259, 1 Feb. 2024, pp. 129420–129420, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129420>. Accessed 20 Feb. 2024.