

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Efeitos da administração da inulina sobre a microbiota e alterações comportamentais relacionadas a comportamentos do tipo obsessivos-compulsivos e ansiosos em camundongos lactentes filhos de mães tratadas com antígenos solúveis de *Toxoplasma gondii* (STAg)

Victória Leandra Nunes de Assis

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia, da
Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia - MG
Julho de 2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Efeitos da administração da inulina sobre a microbiota e alterações comportamentais relacionadas a comportamentos do tipo obsessivos-compulsivos e ansiosos em camundongos lactentes filhos de mães tratadas com antígenos solúveis de *Toxoplasma gondii* (STAg)

Victória Leandra Nunes de Assis

Prof^a. Dr^a. Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini
Dr. Frederico Rogério Ferreira

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia, da
Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia - MG
Julho de 2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Efeitos da administração da inulina sobre a microbiota e alterações comportamentais relacionadas a comportamentos do tipo obsessivos-compulsivos e ansiosos em camundongos lactentes filhos de mães tratadas com antígenos solúveis de *Toxoplasma gondii* (STAg)

Victória Leandra Nunes de Assis

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini
Instituto de Ciências Biomédicas – UFU

Co-orientador: Dr. Frederico Rogério Ferreira
Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em ___/___/___

Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior

Uberlândia - MG
Julho de 2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Efeitos da administração da inulina sobre a microbiota e alterações comportamentais relacionadas a comportamentos do tipo obsessivos-compulsivos e ansioso em camundongos lactentes filhos de mães tratadas com antígenos solúveis de *Toxoplasma gondii* (STAg)

Victória Leandra Nunes de Assis

Aprovado pela Banca Examinadora em: 09/07/2025 Nota: 95

VBGSpini

Vanessa Beatriz Monteiro Galassi Spini

Uberlândia, 9 de julho de 2025

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, minha maior apoiadora, que plantou em mim o sonho de estudar na Universidade Federal de Uberlândia desde criança. Se hoje realizo esse sonho, é graças a ela.

Ao meu pai, que me apoiou desde o início e sempre acreditou em mim. Ao meu padrasto, por todo apoio a mim e à minha mãe nesses anos, e por não medir esforços para nos ajudar.

À minha família, avós, tios e tias, por sempre estarem me esperando em casa com muito carinho e suporte em todos os momentos. Ao meu amor, Guilherme, por todo o carinho e apoio, e por sempre me mostrar que sou capaz de vencer todos os desafios da vida.

Aos meus amigos que fiz na faculdade, em especial a Felipe, Henrique, Luis Felipe, Thomas, Victor, Letícia, Sabrinna, Amanda, Mariana e Gabriela, que estiveram comigo em todos os momentos, bons e ruins, durante esses anos. Vocês fizeram essa caminhada ser mais leve. À Bateria Incendiária, parte fundamental da minha graduação, por me oferecer os melhores momentos de alívio, diversão, competição e muito samba.

À minha orientadora Vanessa, por todo apoio e acolhimento durante esses dois anos de pesquisa. Saio da graduação preparada para os próximos desafios da pesquisa científica. Às minhas colegas de projeto, Ana Luiza e Agatha, pelo companheirismo e ajuda durante esse tempo.

A Deus, por me permitir viver com saúde e aproveitar o melhor que a vida pode oferecer.

“Já que é preciso aceitar a vida, que seja então corajosamente.”

Lygia Fagundes Telles

RESUMO

Diversos estudos têm demonstrado a influência da microbiota no desenvolvimento e no funcionamento do sistema nervoso central, sendo a disbiose considerada uma possível causa de distúrbios mentais. Sabe-se também que desafios imunogênicos que ocorrem com a mãe durante a gestação (imunoativação maternal) desencadeiam eventos inflamatórios associados a distúrbios comportamentais na prole. Inúmeras evidências têm mostrado o papel da microbiota intestinal sobre o sistema nervoso central e a importância de prébióticos, como a inulina, na modulação dessa microbiota. Fêmeas de camundongos C57BL/6 grávidas foram divididas em dois grupos, um recebendo STAg e o outro PBS via intraperitoneal em E16. Os filhotes receberam tratamento oral, água ou inulina, do 3º ao 21º dia de vida. Os animais adultos foram submetidos ao teste comportamental de enterramento de esferas de vidro, analisando comportamento repetitivo e compulsivo. O grupo STAg + Água enterrou o maior número de esferas comparado ao grupo PBS + Água (controle), tanto para a prole de machos quanto fêmeas. Nas fêmeas, também foi possível observar que a inulina (grupo STAg + Inulina) diminuiu o comportamento repetitivo comparado ao grupo que não foi tratado (STAg + Água). Concluiu-se que o desafio imunogênico com STAg em mães causou alterações comportamentais na prole em idade adulta, e a inulina, na concentração utilizada nesse experimento e administrada durante a fase de lactação, conseguiu reverter o efeito do STAg apenas no grupo das fêmeas.

Palavras-chave: imunoativação maternal, microbiota, inulina, teste enterramento de esferas.

ABSTRACT

Several studies have shown the influence of microbiota on the development and functioning of the central nervous system, and dysbiosis is considered a possible cause of mental disorders. It is also known that immunogenic challenges that occur to the mother during pregnancy (maternal immune activation) trigger inflammatory events associated with behavioral disorders in the offspring. Numerous studies have shown the role of the intestinal microbiota on the central nervous system and the importance of prebiotics, such as inulin, in modulating microbiota. Pregnant C57BL/6 female mice were divided into two groups, one receiving STAg and the other PBS intraperitoneally at E16. The pups received oral treatment, water or inulin, from the 3rd to the 21st day of life. The adult animals were subjected to the marble burying test, analyzing repetitive and compulsive behavior. The STAg + Water group buried the highest number of spheres compared to the PBS + Water (control) group, for both male and female offspring. In females, it was also observed that inulin (STAg + Inulin group) decreased repetitive behavior compared to the untreated group (STAg + Water). It was concluded that the immunogenic challenge with STAg in mothers caused behavioral changes in the offspring in adulthood, and inulin, at the concentration used in this experiment and administered during the lactation phase, was able to reverse the effect of STAg only in the STAg group.

Keywords: maternal immune activation, microbiota, inulin, marble burying test.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Transtornos neuropsiquiátricos: Transtorno Obsessivo-Compulsivo (TOC) e Transtornos de Ansiedade.....	1
1.2. Microbiota e Eixo Intestino-encéfalo	9
1.3. Imunoativação Maternal (MIA)	14
1.4. Inulina.....	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivos gerais.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
2.2.1 Avaliar a hipótese de que o desafio imunogênico de camundongos fêmeas grávidas por antígeno solúvel de <i>Toxoplasma gondii</i> (STAg) está relacionada a alterações no desenvolvimento neuronal de sua prole e, consequentemente, na fase adulta, resultar em alterações comportamentais relacionadas a transtornos do tipo obsessivo-compulsivo (TOC) e ansioso.	17
2.2.2. Testar o potencial da administração do prebiótico inulina, na fase lactente da prole, em evitar o aparecimento destes transtornos na fase adulta, a partir da modulação da microbiota, tendo ação neuroprotetora.	17
3. METODOLOGIA	17
3.1. Animais	17
3.2. Fase gestacional.....	18
3.3. Desafio imunogênico com Antígenos Solúveis de <i>Toxoplasma gondii</i> (STAg).....	19
3.4. Fase de tratamento.....	20

3.5.	Delineamento experimental.....	21
3.6.	Teste comportamental - Enterramento de Esferas de Vidro (<i>Marble Burying Test</i>)	22
3.7.	Análise dos resultados	23
3.8.	Eutanásia	24
4.	RESULTADOS	24
4.1.	<i>Marble burying test – Enterramento de esferas de vidro</i>	24
5.	DISCUSSÃO	27
6.	CONCLUSÃO	30
7.	REFERÊNCIAS.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

1. CSTC – circuito cortico-estriato-talâmico-cortical
2. CUMS – estresse crônico mínimo e imprevisível
3. DSM – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
4. HHA – eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal
5. MIA – Imunoativação Maternal
6. OMS – Organização Mundial da Saúde
7. PBS – solução salina tamponada com fosfato
8. REBIR – Rede de Biotérios
9. SCFAs – ácidos graxos de cadeia curta
10. SNC – Sistema Nervoso Central
11. SNE – Sistema Nervoso Entérico
12. SRIs – inibidores da recaptação de serotonina
13. STAg –抗ígenos solúveis de *Toxoplasma gondii*
14. TAG – Transtorno de Ansiedade Generalizada
15. TEA – Transtorno do Espectro Autista
16. TGI – trato gastrointestinal
17. TOC – Transtorno Obsessivo-Compulsivo

1. INTRODUÇÃO

1.1.Transtornos neuropsiquiátricos: Transtorno Obsessivo-Compulsivo (TOC) e Transtornos de Ansiedade

Os transtornos neuropsiquiátricos como transtorno de ansiedade generalizada (TAG), transtorno do espectro autista (TEA), transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) e outras desordens similares são caracterizados por alterações no comportamento, humor, sociabilidade, pensamentos e percepções do indivíduo e afigem milhões de pessoas pelo mundo. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que no ano de 2019 quase 1 bilhão de pessoas viviam com algum transtorno mental. A prevalência dessas desordens aumentou consideravelmente pós pandemia de COVID-19, principalmente de queixas de depressão, ansiedade e estresse pós-traumático (DOS SANTOS BRASIL; RAYOL; DA CONCEIÇÃO CAETANO SIQUEIRA, 2021). Aproximadamente 3% da população mundial apresenta TOC (STEIN et al., 2019). A desordem se mostrou mais prevalente em pessoas de 18 a 29 anos, porém cerca de 50% das pessoas apresentam sintomas antes dos 18 anos (VEALE; ROBERTS, 2014). O transtorno afeta tanto homens quanto mulheres, porém existem diferenças, como a manifestação da desordem em uma idade mais jovem em homens (BROCK; RIZVI; HANY, 2025).

O TOC é um transtorno caracterizado principalmente pelos pensamentos obsessivos, podendo ser medos irracionais, imagens ou sentimentos que o indivíduo não consegue evitar (VEALE; ROBERTS, 2014). Estas obsessões são acompanhadas da compulsão, que é composta por comportamentos repetitivos que surgem como um alívio temporário da ansiedade causada pela obsessão (RUNGE et al., 2023). Muitas vezes, a realização da compulsão causa alívio temporário para o indivíduo, porém pode acarretar mais problemas, como a ansiedade relacionada ao TOC (MURPHY; EVELYN STEWART; OBREGON, 2016).

Os sintomas obsessivos-compulsivos observados em pacientes são relativamente parecidos e caem na mesma classe, possibilitando classificá-los em 5 grandes grupos: obsessões relacionadas a contaminação (mais comum), acompanhados da compulsão de limpeza; pensamentos envolvendo machucar a si mesmo ou a outros; obsessões com simetria e organização, causando hábitos compulsórios de contar repetidamente ou organizar; pensamentos “proibidos” de cunho sexual ou agressivo, muitas vezes acompanhados de compulsões envolvendo religião e rituais; e sintomas envolvendo acumulação compulsiva de objetos (STEIN et al., 2019).

No estudo de Stein e colaboradores (2019), utilizando os dados da Pesquisa Nacional de Comorbidades realizada sobre o TOC, constatou-se que 90% dos pacientes entrevistados diagnosticados com TOC de acordo com o protocolo para diagnóstico estabelecido pelo DSM-IV (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais) também apresentavam características de outros distúrbios descritos no DSM-IV (STEIN et al., 2019). Dentre estes distúrbios, os de ocorrência mais comum em pacientes com TOC são os transtornos de ansiedade, transtornos depressivos e de abuso de substâncias (STEIN et al., 2019). Essas comorbidades podem aparecer tanto como consequência do TOC, quanto o contrário, em que o paciente desenvolve o TOC em decorrência de outros distúrbios (SINGH; ANJANKAR; SAPKALE, 2023).

Os transtornos de ansiedade são caracterizados por sentimento de medo, preocupação e antecipação de perigos ou situações futuras que gera sofrimento e sintomas ansiosos. Estes transtornos podem se manifestar por um motivo específico ou “gatilho”, como também por episódios de estresse como na síndrome do pânico (NARROW et al., 2013). A manifestação desses sintomas também causa respostas fisiológicas no corpo, através de estímulos do córtex pré-frontal e amigdala, que ativam uma resposta de luta ou fuga que se manifesta com taquicardia, suor e náusea (JAVAID et al., 2023). De acordo com a OMS, cerca de 4% da

população mundial apresenta algum transtorno de ansiedade, tornando esse tipo de desordem entre as mais comuns atualmente (ALONSO et al., 2018). As manifestações mais comuns são o transtorno de ansiedade generalizada (TAG), síndrome do pânico e transtorno de ansiedade social (KENWOOD; KALIN; BARBAS, 2022).

Os transtornos comportamentais no geral afetam negativamente a vida de milhares de pessoas e cada vez mais a saúde mental vem se tornando um tópico de discussão entre as organizações de saúde. Muito se discute sobre as causas para o desenvolvimento de tais transtornos. No TOC, a genética é um dos fatores que aparecem como possível e principal causa, instigando a realização de estudos de genômica relacionados com o TOC em si e com os sintomas obsessivos-compulsivos isoladamente (MAHJANI et al., 2021). Alguns estudos demonstram que a evidência de hereditariedade é maior em famílias em que o TOC se manifesta mais cedo (na infância ou na adolescência), sendo 13,8%, comparado com parentes em que os sintomas aparecem tarde (vida adulta) (MAHJANI et al., 2021). Além disso, estudos que procuram genes específicos relacionados com o TOC concluíram que o transtorno é altamente poligênico, porém ainda é preciso realizar ensaios com um maior número de participantes para obter resultados significativos envolvendo genes específicos (MAHJANI et al., 2021).

Estudos mostram que as alterações morfológicas no cérebro de pacientes com TOC estão concentradas principalmente em estruturas do circuito cortico-estriato-talâmico-cortical (CSTC) (STEIN et al., 2019). Essas estruturas estão envolvidas em processos cognitivos, sensorimotores, afetivos e motivacionais, funções alteradas no TOC. Através de análises de imagem do cérebro, foi possível observar mudanças de tamanho e superfície em algumas dessas regiões (STEIN et al., 2019).

Alterações relacionadas a neurotransmissores são notadas em quadros de transtornos mentais, abrindo caminhos para o tratamento farmacológico. No TOC, foi observado que pacientes respondiam bem a tratamentos com fármacos inibidores da recaptação de serotonina

(SRIs) combinados a psicoterapia, indicando que o sistema serotoninérgico pode estar envolvido no funcionamento desse distúrbio, além do mesmo estar presente nos circuitos cortico-estriato-talâmico-cortical (CSTC) (STEIN et al., 2019). Outro neurotransmissor envolvido na neurofisiologia do TOC é a dopamina. É sabido que a dopamina desempenha um papel importante sobre comportamentos estereotípicos e está envolvida em processos cognitivos como processamento de recompensas, características que são alteradas em casos de TOC (STEIN et al., 2019). Alguns estudos reportaram a associação entre alterações em genes catecolaminérgicos e o TOC, além de alterações em receptores dopaminérgicos, como a diminuição de receptores de dopamina D2 no estriato de modelos de TOC (STEIN et al., 2019).

Além de mecanismos fisiológicos, o ambiente pode interferir fortemente no surgimento ou agravamento de transtornos mentais. Um exemplo de alteração ambiental que influenciou na saúde mental de milhares de pessoas foi a pandemia de COVID-19 (ZACCARI et al., 2021). A pandemia trouxe o agravamento de quadros depressivos e de ansiedade no geral, além do aumento de comportamentos compulsivos de limpeza, característico no TOC, pelo contexto do momento (ZACCARI et al., 2021).

Outra forma da influência do ambiente no surgimento dessas doenças pode ser a época de nascimento, atrelada às doenças endêmicas em determinadas regiões e momentos do ano. O estudo de Ferreira e colaboradores (2020) discute a hipótese da influência da época de nascimento com o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos e dependência química (FERREIRA et al., 2020). A alteração ambiental causada pelas estações do ano, como épocas úmidas e secas, de mais alta e mais baixa temperatura, contribui para a sazonalidade de certos tipos de doenças, como gripes e arboviroses. Por exemplo, estudos mostraram que camundongos infectados com o vírus da dengue (genótipo 3) apresentaram maiores níveis de ansiedade, apoptose neuronal e inflamação no hipocampo, comparado com animais controle (DE MIRANDA et al., 2012 apud FERREIRA et al., 2020). Nesse sentido, a pesquisa de

Ferreira concluiu que a exposição de gestantes a fatores sazonais como infecções por influenza e arboviroses pode aumentar o risco para o desenvolvimento de desordens psíquicas, porém esse risco pode estar combinado com outros fatores ambientais, como a biodisponibilidade de vitamina D e ciclo de luz, que são específicos de cada região (FERREIRA et al., 2020).

Ainda sobre a influência do ambiente no desenvolvimento de desordens psiquiátricas, o estresse maternal durante a gravidez foi outro fator de risco demonstrado em estudos. Evidências mostram que o estresse maternal causado por fatores ambientais tem influências diretas na prole, podendo estar associado com o desenvolvimento de doenças psiquiátricas, como transtorno do espectro autista (TEA) (CAPARROS-GONZALEZ et al., 2021). O risco de desenvolvimento desses distúrbios se relaciona com alterações do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA) em partes responsáveis pela liberação de cortisol, resultando em altos níveis do hormônio, somado a alterações na liberação de neurotransmissores, como dopamina, serotonina e noradrenalina (CAPARROS-GONZALEZ et al., 2021). Esse estresse pode ser advindo de situações traumáticas, ansiedade, depressão ou grandes catástrofes, como o acidente de Chernobyl e guerras, sendo que a maior parte desses eventos estudados por Caparros-Gonzalez e colaboradores (2021), causou aumento da incidência de distúrbios mentais nas proles, com predominância de casos de autismo, ansiedade e TDAH (CAPARROS-GONZALEZ et al., 2021).

Existem crescentes evidências científicas que mostram a influência da microbiota intestinal no funcionamento do sistema nervoso central (SNC), através de vários mecanismos (MAIUOLO et al., 2021). Essa relação se dá a partir do eixo microbiota-intestino-encéfalo, que é uma conexão bidirecional entre o trato gastrointestinal (TGI) e o SNC (Figura 1) (BENDRISS; MACDONALD; MCVEIGH, 2023).

Um desses mecanismos é a via endócrina, em que metabólitos produzidos pelas bactérias da microbiota estimulam a secreção de diversas moléculas, como os ácidos graxos de cadeia

curta (SCFAs), hormônios e neurotransmissores, que regulam funções no SNC (BENDRISS; MACDONALD; MCVEIGH, 2023). Além disso, a disbiose, isto é, um desequilíbrio na microbiota – relacionado tanto à quantidade quanto à distribuição dos microrganismos – pode reduzir a produção destes SCFAs e causar alterações na permeabilidade da barreira intestinal, levando a uma resposta inflamatória (BENDRISS; MACDONALD; MCVEIGH, 2023; MAIUOLO et al., 2021). A produção de citocinas (proteínas de sinalização) pró-inflamatórias pelas células imunes existentes no intestino, estimuladas pelo estado de disbiose, podem levar a neuroinflamação e causar alterações no SNC (BENDRISS; MACDONALD; MCVEIGH, 2023).

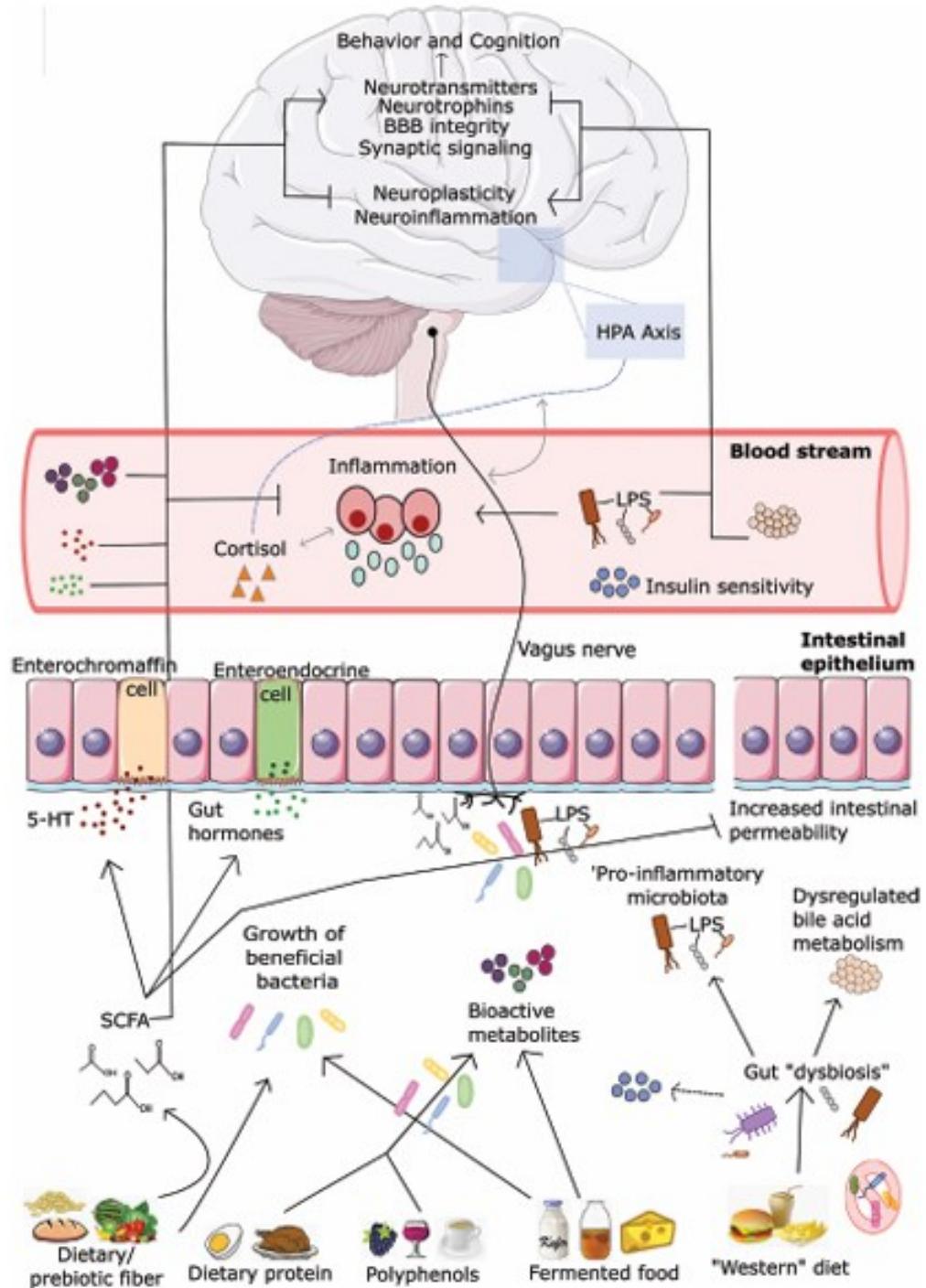


Figura 1: Funcionamento da conexão intestino-encéfalo. Alimentos ricos em prebióticos e probióticos beneficiam o crescimento de microbiota saudável que estimula a produção de metabólitos bioativos, neurotransmissores e hormônios intestinais, afetando o SNC por vias de sinalização diretas ou indiretas. A estimulação do nervo vago por metabólitos microbianos também é outro meio de comunicação entre o intestino e o SNC. A má nutrição leva à disbiose, cujos produtos microbianos podem ocasionar aumento da permeabilidade da barreira intestinal, inflamação e processos cerebrais disfuncionais. Figura retirada de BERDING et al., 2021.

Outro mecanismo de comunicação entre o intestino e o SNC é através do nervo vago. Ele serve de “ponte” para a transmissão de sinais, visto que a microbiota pode modular a produção de neurotransmissores como serotonina, dopamina, noradrenalina, acetilcolina e glutamato através da produção de precursores. Essas moléculas então se ligam aos neurônios aferentes primários do sistema nervoso entérico, estimulando o transporte retrógrado pelo nervo vago (BENDRISS; MACDONALD; MCVEIGH, 2023).

Estudos investigando o estado de disbiose analisando o microbioma de pacientes com TOC encontraram um aumento de bactérias da família *Rikenellaceae*, que estão associadas com inflamação no TGI, e diminuição de bactérias do gênero *Coprococcus* (BENDRISS; MACDONALD; MCVEIGH, 2023). Além disso, bactérias de espécies como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* foram apontadas importantes para produção de serotonina no intestino e, como visto anteriormente, a serotonina é um importante neurotransmissor envolvido na neurofisiologia do TOC (BENDRISS; MACDONALD; MCVEIGH, 2023). O estudo de Sanikhani e colaboradores (2020) utilizando ratos Wistar modelos de TOC, tratados com *Lactobacillus casei* Shirota, obteve resultados positivos na diminuição de comportamentos do tipo obsessivo-compulsivo, semelhantes a animais controle negativo e tratados com fluoxetina (SANIKHANI et al., 2020). Isso sugere um possível tratamento para o TOC abordando a modulação da microbiota e do estado de disbiose.

Assim, o estudo da influência da microbiota sobre o funcionamento do sistema nervoso central no seu desenvolvimento desde a gestação vem revelando possíveis causas para transtornos neuropsiquiátricos como ansiedade, depressão, autismo, déficits de aprendizado e da sociabilidade (KELLY et al., 2016).

1.2. Microbiota e Eixo Intestino-Encéfalo

A microbiota intestinal compreende o conjunto de microrganismos que habitam o trato gastrointestinal, composta por procariotos como as bactérias, que representam a maior parcela dos microrganismos, assim como arqueas, vírus, bacteriófagos e fungos, cuja função ainda é pouco explorada (MANGIOLA et al., 2016). Este conjunto de micróbios formam complexos simbióticos entre si e com o hospedeiro, sendo essas relações, na maior parte das vezes, não-patológicas e benéficas ao organismo (CHRISTIAN MILANI, SABRINA DURANTI, FRANCESCA BOTTACINI et al., 2017). As populações da microbiota variam ao longo do trato gastrointestinal, sendo os *Bacteroidetes* e *Firmicutes* os filos predominantes (ZHU; TU; CHEN, 2022). Estima-se que cerca de 100 trilhões de células microbianas compõem a microbiota intestinal, número 10 vezes maior do que a soma de todas as outras células do corpo humano (GENEROSO et al., 2021). As espécies de microrganismos que compõem a microbiota variam de indivíduo para indivíduo, porém, as funções exercidas por essas bactérias e os sinais produzidos se assemelham. Cerca de 3,3 milhões de genes microbianos compõem o microbioma – 150 vezes maior que o genoma humano – e codificam funções importantes não só para o intestino, mas também para os demais sistemas do corpo humano (GENEROSO et al., 2021).

Estudos sobre a microbiota intestinal demonstram sua importância para a saúde, principalmente através da liberação de metabólitos que contribuem com a fisiologia do corpo humano, além de contribuir na maturação do sistema imune, induzindo resposta imune inata e adquirida e no desenvolvimento neuronal (LU et al., 2018; MANGIOLA et al., 2016). Ademais, estudos com animais livres de germe (*germ free*) mostraram que a ausência da microbiota intestinal leva ao mal funcionamento do sistema imune (MAIUOLO et al., 2021), e foi demonstrado que alterações na microbiota intestinal levaram à superestimulação do sistema imune, causando maior incidência de desenvolvimento de doenças autoimunes como lúpus,

artrite reumatoide e esclerose múltipla (BROWN; KENNY; XAVIER, 2019). Isso pode acontecer porque moléculas produzidas pela microbiota normal estimulam a transcrição do gene *fox3*, que codifica a proteína FOXP3, envolvida na produção de células T regulatórias. Quando há disbiose, toda essa cascata regulatória pode ser perturbada, levando à resposta autoimune (MAIUOLO et al., 2021).

O eixo intestino-encéfalo vem sendo cada vez mais alvo de estudos, delineando a forma como o intestino e o cérebro colaboram e exercem influência sobre o funcionamento um do outro. Dentro desse contexto, o intestino é considerado o “segundo cérebro”, por concentrar uma grande quantidade de neurônios, que formam o Sistema Nervoso Entérico (SNE) (APPLETON, 2018). Esses neurônios presentes no trato gastrointestinal produzem e secretam moléculas importantes para a motilidade intestinal, digestão e fluxo sanguíneo, e se comunicam com o cérebro principalmente através do nervo vago. A serotonina (5-HT) é um neurotransmissor extremamente importante para as funções intestinais e cerebrais, e cerca de 95% dessa molécula é produzida de forma endógena pelas células enterocromafins presentes na luz do intestino (GHEORGHE et al., 2019).

A relação da microbiota com os distúrbios mentais pode se dar através de vários fatores, que serão descritos a seguir. Uma das formas em que a microbiota exerce influência sobre a presença ou ausência de sintomas relacionados a distúrbios mentais é através da regulação do sistema imune. Os sinais microbianos, isto é, metabólitos excretados pelos microrganismos que podem ter função regulatória no nosso organismo agem, por exemplo, sobre o equilíbrio entre células T auxiliares e células T regulatórias (BROWN; KENNY; XAVIER, 2019). Alguns metabólitos conhecidos por cumprirem esse papel são o triptofano e os ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), que podem se originar da microbiota comum, como os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (OUABBOU et al., 2020). Os SCFAs são produzidos exclusivamente pelas bactérias da microbiota através da fermentação das fibras de alimentos, uma vez que o corpo

humano não produz as enzimas necessárias para tal função (MAYER; NANCE; CHEN, 2022).

Estudos mostram que a produção destes ácidos graxos de cadeia curta estimula a secreção do hormônio GLP-1, responsável pela sensação de saciedade, e os principais SCFAs produzidos no intestino são o butirato, propionato e acetato (Figura 2) (MAYER; NANCE; CHEN, 2022).

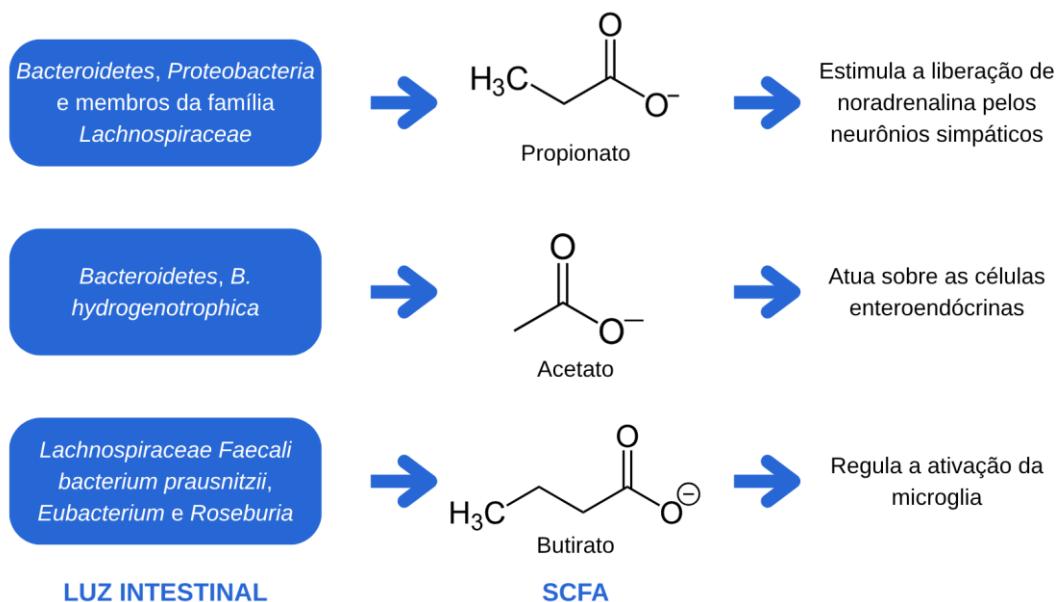


Figura 2: Principais ácidos graxos de cadeia curta produzidos no intestino pelas bactérias fermentadoras. Figura adaptada de LABETOULLE et al., 2024.

Durante as fases da vida, desde o nascimento até a senilidade, a microbiota se desenvolve juntamente com o organismo, e existem janelas temporais que marcam essas mudanças e que são peças importantes na investigação de doenças que podem ter relação com a microbiota. Ao nascer, a primeira exposição da criança ao mundo marca o contato com vários dos microrganismos que irão fazer parte da microbiota ao longo da vida. Neste momento, fatores como o ambiente e o tipo de parto podem influenciar nessa colonização; por exemplo, um bebê nascido de parto normal entrará em contato com a microbiota vaginal, enquanto na cesariana, o contato será com a microbiota da epiderme (MAIUOLO et al., 2021). A fase de amamentação, primeira infância, adolescência, fase adulta e senescência são exemplos de momentos em que

a microbiota intestinal sofre importantes alterações, como demonstra a Figura 3 (NYANGAHU; JASPAN, 2019). Estas janelas temporais de formação e alterações na microbiota coincidem com momentos de mudanças em outras estruturas, como o cérebro (PENDYALA et al., 2017).

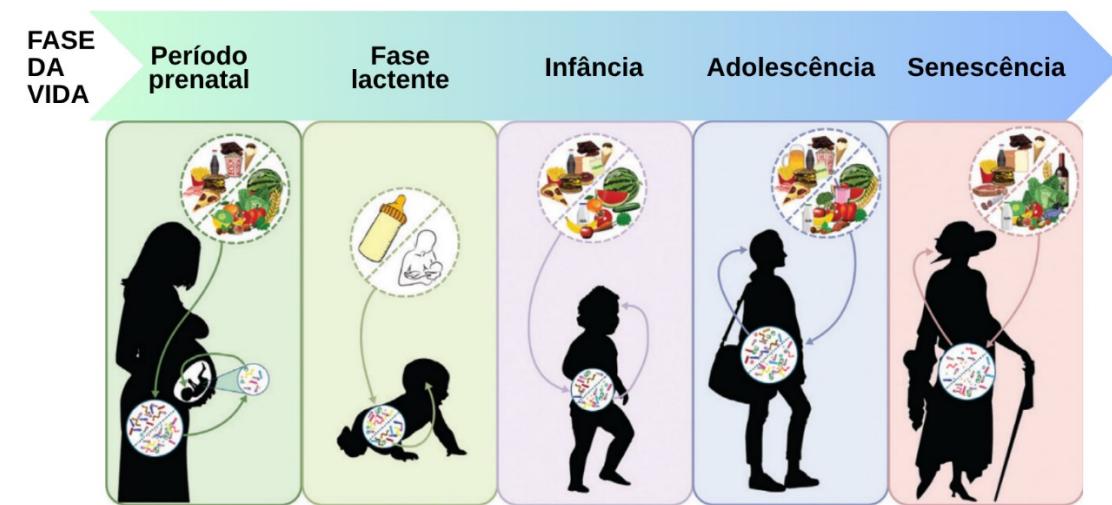


Figura 3: Janelas temporais de desenvolvimento da microbiota intestinal. Figura adaptada de BERDING et al., 2021.

Após o nascimento, a fase de lactação é um momento extremamente importante para a formação da microbiota intestinal. Os microrganismos que irão colonizar e se consolidar no trato gastrointestinal do bebê estão diretamente ligados com a amamentação ou com a forma como ele será alimentado. Isso porque, durante a amamentação, a criança entra em contato direto com os nutrientes da mãe, microrganismos e agentes antimicrobianos, e tudo isso modula o sistema imune e a microbiota do bebê (MADY et al., 2023). O leite materno contém todos os elementos essenciais para o desenvolvimento da criança e de sua microbiota, e a composição do leite varia entre proteínas, minerais, lipídios, água e microrganismos (LEITE NUNES, 2014). A composição da microbiota do leite pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1: Composição bacteriana do leite materno. Dados adaptados de LEITE NUNES, 2014.

Filo	Gênero	Espécie
Firmicutes	<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. fermentum, L. gasseri,</i> <i>L. reuteri, L. salivarius</i>
	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. epidermidis</i>
	<i>Streptococcus</i>	<i>S. lactarius, S. salivarius, S.</i> <i>termophilus</i>
	<i>Leuconostoc</i>	
	<i>Lactococcus</i>	
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. breve, B. bifidum, B.</i> <i>longum</i>
	<i>Corynebacterium</i>	
	<i>Propionabacterium</i>	
Proteobacteria	<i>Ralstonia</i>	
	<i>Serratia</i>	
	<i>Sphingomonas</i>	

Como visto anteriormente, o eixo intestino-encéfalo tem influência direta na ocorrência e desenvolvimento de distúrbios comportamentais e de humor. A relação da microbiota intestinal com o hospedeiro é mútua, ou seja, o hospedeiro oferece recursos para a sobrevivência destes microrganismos e estes agem no corpo humano através da secreção de metabólitos. Em transtornos como a depressão, estudos analisando as fezes de pacientes diagnosticados em comparação com pacientes saudáveis mostram que há alterações na composição da microbiota

desses grupos, havendo um aumento de *Firmicutes* e *Bacteroidetes* no TGI de pacientes depressivos (BHATTARAI; MUNIZ PEDROGO; KASHYAP, 2016).

1.3. Imunoativação Maternal (MIA)

Anteriormente, foi visto que o estresse materno no contexto psicológico pode afetar a prole de variadas formas, porém, existem eventos imunológicos, conceituados pelo termo imunoativação maternal (MIA), que também cumprem um papel crucial no desenvolvimento neuronal fetal. A imunoativação maternal ocorre quando a gestante é exposta a patógenos virais, bacterianos ou parasitários, ou ainda a antígenos que irão desafiar seu sistema imunológico sem necessariamente causar a doença (DUARTE et al., 2025; HASSIB et al., 2023) Estudos mostram que essa mobilização do sistema imunológico durante a gestação pode alterar o desenvolvimento neuronal e da microbiota da prole , impactando na vida adulta (RADFORD-SMITH et al., 2022; SPINI et al., 2021).

Existem estudos que relacionam a imuno ativação materna, através de infecções com *Toxoplasma gondii* e *Chlamydophila* com o desenvolvimento de desordens mentais, como psicose, na prole (MONROE; BUCKLEY; MILLER, 2015 apud OUABBOU et al., 2020). Portanto, o sistema imune da mãe cumpre um papel extremamente importante no desenvolvimento cerebral da prole, e a imunoativação maternal pode ser, então, a chave para o estudo sobre as origens de distúrbios mentais (ESTES; MCALLISTER, 2016; MADY et al., 2023; RADFORD-SMITH et al., 2022). No estudo de Malkova e colaboradores (2012), utilizando modelos de imunoativação maternal, induzida pelo vírus mimético poly I:C (RNA de fita dupla sintético utilizado para mimetizar infecções virais *in vivo*), foi observado através do teste de enterramento de esferas de vidro comportamento do tipo compulsivo e repetitivo na prole de mães desafiadas (MALKOVA et al., 2012).

Spini e colaboradores (2021) estudaram os efeitos da imunoativação maternal, induzida por antígenos de H1N1 e por antígenos solúveis de *Toxoplasma gondii* (STAg), no comportamento das proles de camundongos Balb C. A imunoativação foi realizada em dois momentos, E6 e E16, que representam respectivamente o primeiro e o segundo trimestre de gestação em humanos. Os resultados mostraram que a exposição maternal aos antígenos suspensos na vacina H1N1 e STAg geraram comportamentos do tipo ansiosos na prole independente da fase gestacional do insulto (se E6 ou E16). Por outro lado, os comportamentos do tipo depressivos induzidos pelo tratamento com antígenos de H1N1 foram independentes da janela temporal ao passo que para o STAg esses comportamentos foram mais evidentes na prole das mães tratadas em E16, sugerindo que as respostas imunológicas aos diferentes agentes impactam de forma diferente a susceptibilidade da prole aos transtornos de humor (SPINI et al., 2021). Existem diversas teorias que investigam como a imunoativação maternal age sobre o neurodesenvolvimento fetal. Alguns estudos explicam que moléculas mediadoras de processos inflamatórios, como as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, podem ser possíveis agentes moduladores da imunoativação maternal, conseguindo atravessar a barreira placentária e influenciar no neurodesenvolvimento do feto (SPINI et al., 2021).

1.4. Inulina

Sabendo-se que a microbiota influencia no humor e que existem janelas temporais em que mudanças na microbiota podem impactar de forma importante no funcionamento do cérebro, a modulação da microbiota pode ser um alvo no tratamento de distúrbios comportamentais e de humor. Nesse sentido, os prebióticos podem então cumprir um papel importante na modulação da microbiota, visto que são substâncias que promovem o crescimento e a atividade de bactérias benéficas no intestino humano (CHUDZIK et al., 2021).

A inulina é uma fibra solúvel composta por unidades de frutose unidas por ligações β (2,1), considerada um prebiótico que contribui para o bom funcionamento do intestino (LE BASTARD et al., 2020). Como é uma fibra que não é digerida pelas enzimas do trato gastrointestinal humano, é fermentada por bactérias do intestino formando ácidos graxos de cadeia curta (LE BASTARD et al., 2020). É encontrada em abundância na natureza, e está presente em vegetais como aspargos, alho-poró, cebola, frutas como banana, e raízes, como chicória e alcachofra de Jerusalém (SZEWCZYK et al., 2023). Estudos mostraram que a inulina de fato contribui para o bom funcionamento da microbiota intestinal, e alguns ainda apontam que a administração da inulina em roedores diminuiu a anedonia (falta de auto cuidado), que está relacionada ao comportamento do tipo depressivo (CHUDZIK et al., 2021; LE BASTARD et al., 2020).

Como visto anteriormente, os SCFAs exercem um papel importante na comunicação intestino-encéfalo. No estudo de Wang e colaboradores (2023), a suplementação de inulina em camundongos C57BL/6J adultos que apresentam estresse crônico resultou em proteção da barreira intestinal, modulação da sinalização da via TLR4/MyD88/NF- κ B (relacionada a respostas neuroinflamatórias), aumento da produção de SCFAs, que contribuiu para integridade da barreira hematoencefálica e melhorias nos testes comportamentais que avaliam comportamentos do tipo depressivo, ansioso e compulsivo (WANG et al., 2023).

Portanto, visto a relação entre a microbiota e o desenvolvimento neuronal, a administração de prebióticos como a inulina em fase lactente – quando a microbiota está em momento crucial de formação – poderia trazer um possível efeito neuroprotetor, evitando o desenvolvimento de transtornos comportamentais no futuro. Investigar se a inulina administrada na fase de lactação exerce esse efeito neuroprotetor poderia trazer importante esclarecimento para a área e contribuir para a busca de tratamentos alternativos e preventivos às doenças psiquiátricas. A inulina é um composto de fácil acesso à população, presente em vários alimentos

principalmente de fonte vegetal. Portanto, pesquisar sobre o potencial de compostos acessíveis como a inulina para tratamentos de transtornos neuropsiquiátricos é de grande interesse social.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Avaliar a relação entre a imunoativação maternal e o desenvolvimento de transtornos mentais na prole, além do efeito do prebiótico inulina na modulação da microbiota da prole e consequente ação neuroprotetora.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar a hipótese de que o desafio imunogênico de camundongos fêmeas grávidas por antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii* (STAg) está relacionada a alterações no desenvolvimento neuronal de sua prole e, consequentemente, na fase adulta, resultar em alterações comportamentais relacionadas a transtornos do tipo obsessivo-compulsivo (TOC) e ansioso.

2.2.2. Testar o potencial da administração do prebiótico inulina, na fase lactente da prole, em evitar o aparecimento destes transtornos na fase adulta, a partir da modulação da microbiota, tendo ação neuroprotetora.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Foram disponibilizados 30 camundongos machos e fêmeas da linhagem C57BL/6J pela Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR-UFU). Os animais foram alocados em gaiolas com livre acesso à alimentação e água potável e filtrada (*ad libitum*) e mantidos num regime de luz padrão (12h claro/12h escuro). O alimento fornecido para os roedores foi a ração BioBase

BioTec Alimento Equilibrado da indústria Base Química Produtos Químicos LTDA, de Águas Frias, SC, Brasil. A água foi oferecida em bebedouros individuais presentes nas gaiolas, e a manutenção (troca de caixas, bebedouro e comida) foi feita semanalmente pelos próprios funcionários da REBIR.



Figura 4: Gaiolas onde são mantidos os animais na REBIR. Arquivo pessoal.

A pesquisa foi aceita pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia com número de protocolo 23117.037394/2022-63.

3.2. Fase gestacional

Ao atingir 60 dias de vida, os animais foram alocados em gaiolas para o cruzamento e obtenção dos filhotes, sendo 1 macho para 2 fêmeas. Foi realizada diariamente a observação da

presença de rolha vaginal nas fêmeas, como mostra a Figura 6, e quando presente marca o dia zero (E0) da gestação.

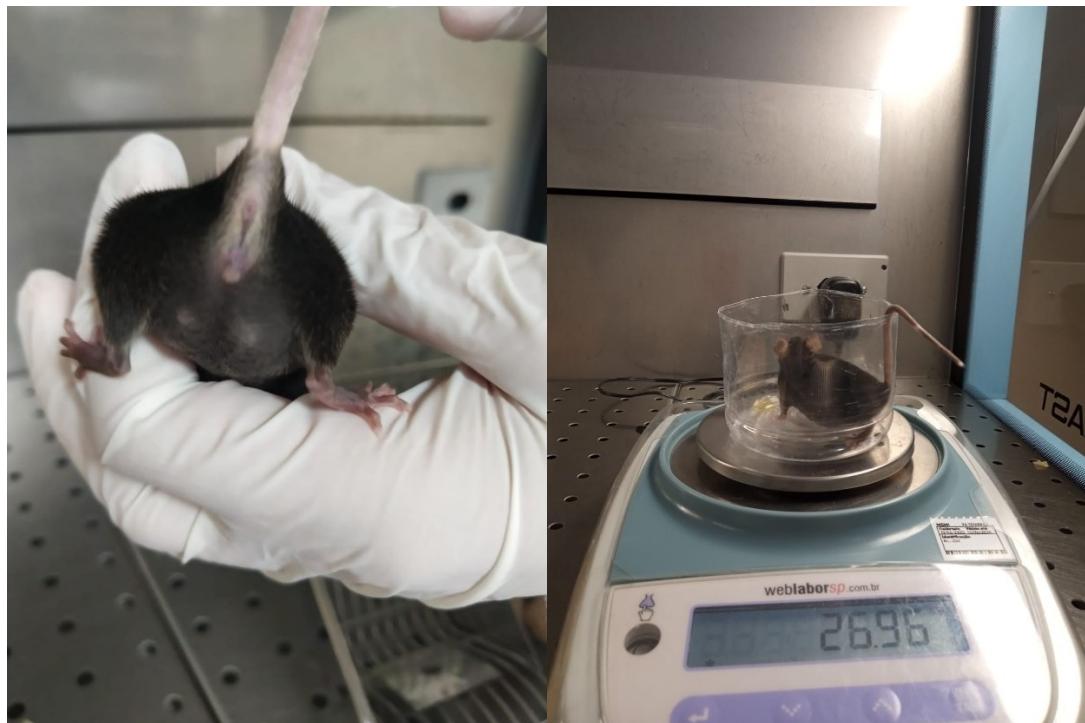


Figura 5: Observação da rolha vaginal e monitoramento da gravidez das fêmeas, respectivamente. Arquivo pessoal.

3.3. Desafio imunogênico com Antígenos Solúveis de *Toxoplasma gondii* (STAg)

As fêmeas que ficaram prenhas foram divididas em 4 grupos, e então foi realizada a imunoativação maternal, que foi induzida por uma injeção intraperitoneal contendo antígenos solúveis de *Toxoplasma gondii* (STAg), fornecido por colaboradores da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). O STAg foi administrado no 16º dia via intraperitoneal num volume de 100 µl e concentração de 0,25 µg/µl. Dos 4 grupos de fêmeas, dois receberam STAg via intraperitoneal e outros dois (grupos controle) receberam PBS via intraperitoneal em E16 (16º dia da gestação).

A escolha do 16º dia de gestação para realizar a imunoativação foi baseada em estudos que demonstram esse período como crucial para o desenvolvimento neural dos animais,

possibilitando maiores chances para a indução de sintomas relacionados a transtornos mentais (SPINI et al., 2021).

3.4. Fase de tratamento

Após o nascimento, a prole foi dividida em 4 subgrupos para a fase de tratamentos nos filhotes lactentes. O tratamento administrado foi o prebiótico inulina (fornecido por colaborador da Fiocruz – Rio de Janeiro) em uma concentração à 10% (diluída em água destilada) e o veículo usado para os grupos controle foi a água destilada, ambos administrados via gavagem com pipeta, sendo um volume de 50 µl por dia, do 3º ao 21º dia de vida dos animais (Figura 6). A inulina foi o tratamento escolhido para testar a ação neuroprotetora através da modulação da microbiota, visto sua eficácia em estudos relacionados ao comportamento analisado pelo teste de enterramento de esferas de vidro (WANG et al., 2023).



Figura 6: Tratamento com inulina em filhote lactente. Arquivo pessoal.

3.5. Delineamento experimental

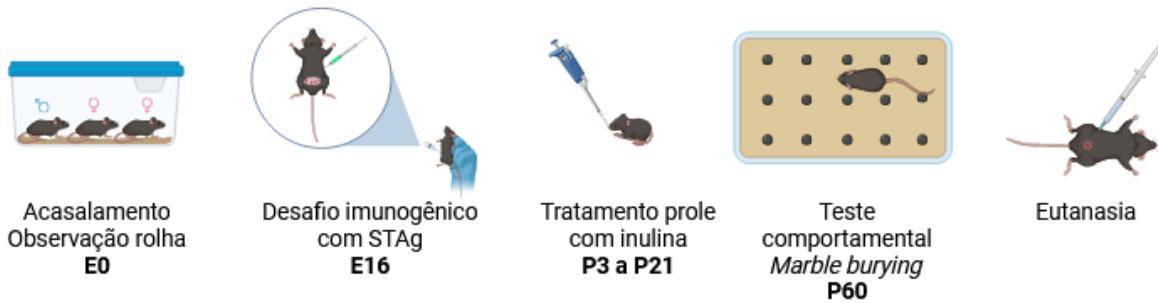


Figura 7: Representação das fases do experimento. E0 e E16: primeiro e 16º dia de gestação; P3, P21 e P60: primeiro, 3º e 60º dia de vida. BioRender, 2025.

Os grupos de filhotes lactentes machos e fêmeas foram divididos da seguinte maneira:

G1: filhotes provenientes de mães que receberam 100 μ L de PBS via intraperitoneal em E16; tratados com 50 μ L de água destilada do 3º ao 21º dia pós nascimento (P3 a P21);

G2: filhotes provenientes de mães que receberam 100 μ L de STAg via intraperitoneal em E16; tratados com 50 μ L de inulina do 3º ao 21º dia pós nascimento (P3 a P21);

G3: filhotes provenientes de mães que receberam 100 μ L de STAg via intraperitoneal em E16; tratados com 50 μ L de água destilada do 3º ao 21º dia pós nascimento (P3 a P21);

G4: filhotes provenientes de mães que receberam 100 μ L de PBS via intraperitoneal em E16; tratados com 50 μ L de inulina do 3º ao 21º dia pós nascimento (P3 a P21).

Após o final do tratamento, os animais experimentais foram separados entre machos e fêmeas, alocados em gaiolas com até 5 animais por gaiola e mantidos em rotina padrão até os 60 dias de vida. Quando atingiram a fase adulta, os machos e fêmeas das proles foram submetidos à fase de testes comportamentais.

3.6. Teste comportamental - Enterramento de Esferas de Vidro (*Marble Burying Test*)

O teste comportamental de enterramento de esferas de vidro (*Marble Burying Test*) é utilizado para avaliar comportamentos do tipo compulsivo e repetitivo, que podem ser vistos em transtornos como TOC, transtorno do espectro autista (TEA) e de ansiedade (ANGOA-PÉREZ et al., 2013). O teste consiste na avaliação de quantidade de esferas enterradas pelo animal durante um determinado período, relacionando o enterramento com o comportamento compulsivo, i.e., quanto mais esferas enterradas, maior o indicativo de ocorrência desse comportamento no animal. O tempo de teste é relativo em diferentes estudos, variando entre 10 a no máximo 20 minutos de teste (NJUNG'E; HANDLEY, 1991).

Para fins de ambientação, os animais experimentais foram levados para a sala de experimentos durante 3 a 7 dias anteriores ao teste e, no dia, pelo menos 30 minutos antes do início de cada teste, sendo feito também o manuseio dos animais durante estes dias. O aparato utilizado para o teste foi uma caixa de acrílico (42 x 24 x 12 cm). A caixa teve seu fundo coberto por uma camada de maravalha (5cm de espessura) e o animal foi colocado na caixa, ficando livre por 5 minutos para explorar o local e se ambientar ao aparato. Após a ambientação, o animal foi levado de volta a sua gaiola e 20 esferas de vidro foram organizadas em uma grade 4x5 (Figura 8). Em seguida, o animal foi transferido para o aparato e deixado livre por 20 minutos (tempo total do teste), sendo gravado por uma câmera posicionada logo acima da caixa. Ao final dos 20 minutos, o animal foi transferido de volta para sua caixa e foram contabilizadas quantas esferas estavam com pelo menos 75% de sua superfície coberta.

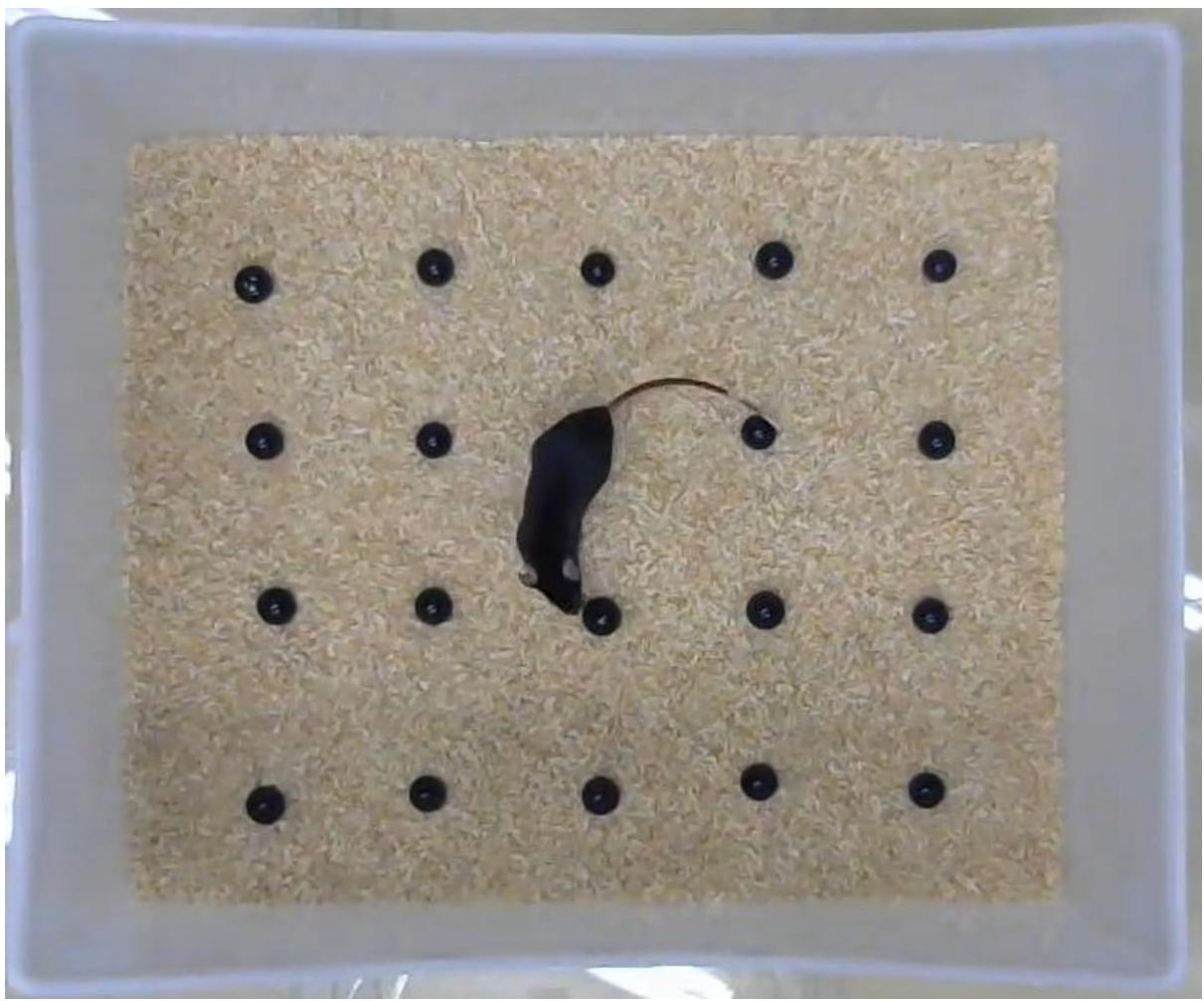


Figura 8: Teste de enterramento de esferas de vidro. Arquivo pessoal.

O teste busca avaliar a relação entre o comportamento do tipo compulsivo e repetitivo e a quantidade de esferas enterradas no período estabelecido. Para isso, na análise posterior ao teste, assistindo os vídeos, foram contabilizadas quantas esferas foram enterradas a cada minuto do teste e quantas foram enterradas no final dos 20 minutos, levando em conta situações em que o animal enterrou e desenterrou alguma esfera.

3.7. Análise dos resultados

A análise estatística dos resultados dos testes comportamentais foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 8.0.1. Foram feitas 3 análises: machos e fêmeas separadamente,

utilizando ANOVA bifatorial (*two way*) em ambas, e uma terceira análise reunindo os resultados de todos os animais, usando ANOVA de uma via (*one way*). Foram consideradas alterações significativas quando o valor de p foi inferior a 0,05 ($p<0,05$). Foi conduzido o teste *post hoc* de Bonferroni para comparar os grupos de interesse em todas as análises.

3.8. Eutanásia

Os animais progenitores machos foram eutanasiados após o acasalamento e fêmeas após o desmame dos filhotes, e a prole foi eutanasiada após os testes comportamentais, seguindo o protocolo de finalização humanizada. Foi feita a injeção intraperitoneal de 25 µl de anestésico, contendo cetamina 80 mg/kg e xilazina 10 mg/kg. Após a injeção, foi verificado se o animal estava desacordado e foi feito, então, o deslocamento cervical. As carcaças dos animais foram acondicionadas a -20°C, para posterior descarte realizado pelo REBIR.

4. RESULTADOS

4.1. *Marble burying test* – Enterramento de esferas de vidro

O teste de enterramento de esferas tem como objetivo analisar o comportamento repetitivo (compulsivo), sintoma do TOC, podendo também ser um indicativo para transtornos de ansiedade e TEA (TAYLOR; LERCH; CHOURBAJI, 2017). Ao longo dos 20 minutos de teste, foram contabilizadas as esferas com até 75% da superfície enterrada, de minuto em minuto.

Foram feitas análises estatísticas da prole formada por machos e fêmeas separadamente e em conjunto, para observar se há diferenças relacionadas ao gênero.

Os resultados das fêmeas estão representados no gráfico da Figura 9.

Observa-se que o grupo de animais provenientes de fêmeas cujas mães foram desafiadas imunologicamente e cuja prole foi tratada com água (STAg + Água) foi o grupo que enterrou a maior quantidade de esferas em relação aos demais. Isso indica que o desafio imunogênico com

STAg causou alterações comportamentais significativas em relação ao grupo controle (PBS + Água) ($p<0,0001$). Além disso, foi possível observar também diferença significativa entre o grupo cujas mães foram desafiadas e os filhotes foram tratados (STAg + Inulina) e o grupo em que as mães foram desafiadas e os filhotes não foram tratados (STAg + Água) ($p<0,0001$), indicando que o tratamento com inulina diminuiu o comportamento repetitivo nos casos em que ocorreu a imunoativação maternal.

O mesmo pode ser observado nos resultados dos machos (Figura 10), com uma diferença mais significativa entre os animais provenientes de mães desafiadas com STAg (STAg + Água) em relação às que receberam PBS (PBS + Água), começando a partir do minuto 9 de teste ($p<0,001$). Para os demais grupos não foi observada diferença significativa.

Foi feita uma terceira análise, utilizando a média final da quantidade de esferas enterradas tanto pelos machos quanto pelas fêmeas, para obter-se um panorama geral do resultado do teste, representada pela Figura 11. Nesse gráfico, é possível observar que houve diferença estatística entre o grupo controle (PBS + Água) e o grupo STAg + Água, validando nosso modelo de imunoativação maternal e nosso grupo controle. Porém, nessa análise, não houve diferença significativa entre os grupos de tratamento com inulina.

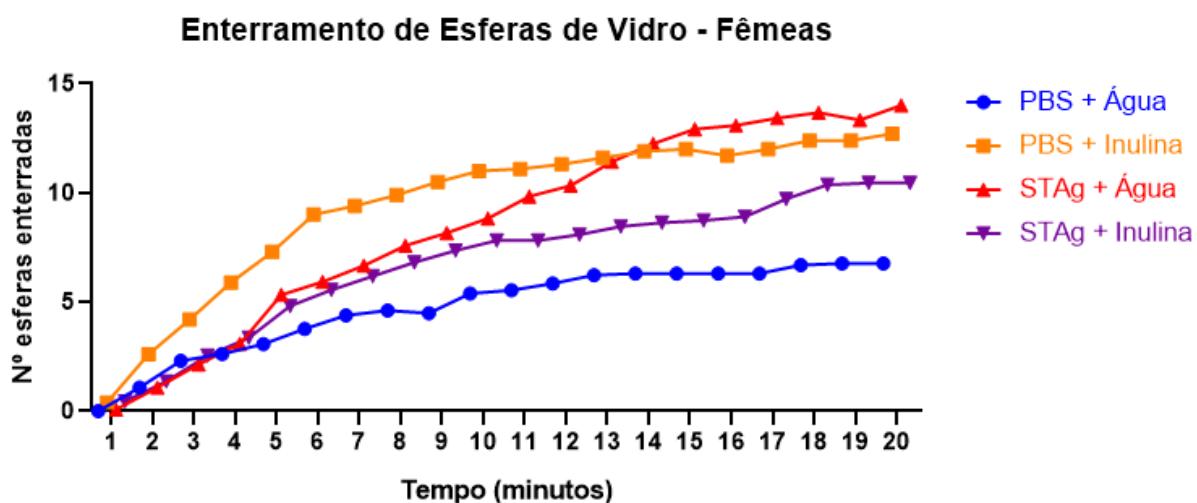


Figura 9: Resultados da quantidade de esferas enterradas pelas fêmeas dos quatros grupos experimentais, representados do minuto 1 ao 20. Houve diferença significativa ($p<0,05$) entre os grupos PBS + Água e STAg + Água.

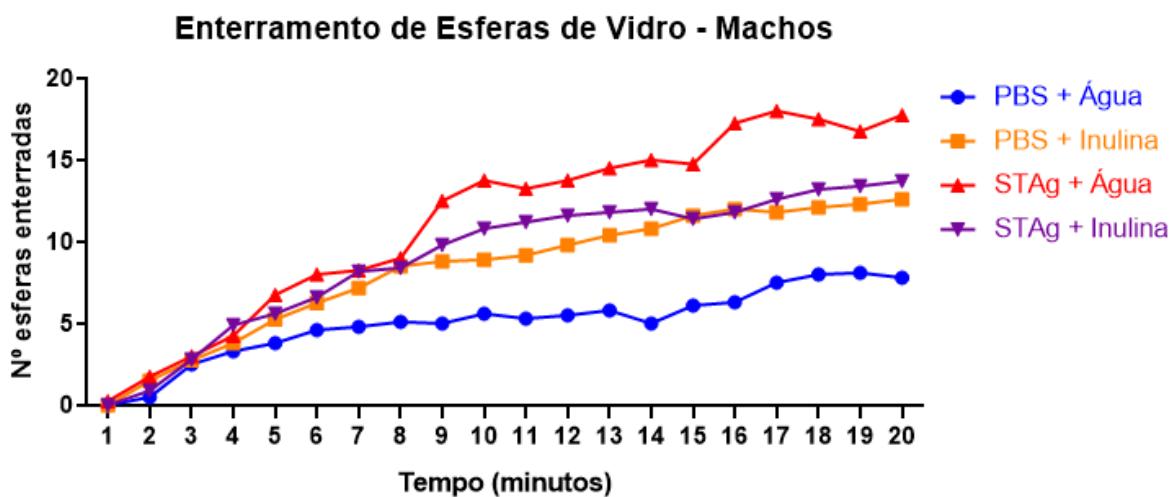


Figura 10: Resultados da quantidade de esferas enterradas pelos machos dos quatros grupos experimentais, representados do minuto 1 ao 20. Houve diferença significativa ($p<0,05$) entre os grupos PBS + Água e STAg + Água.

Enterramento de Esferas de Vidro - Média final

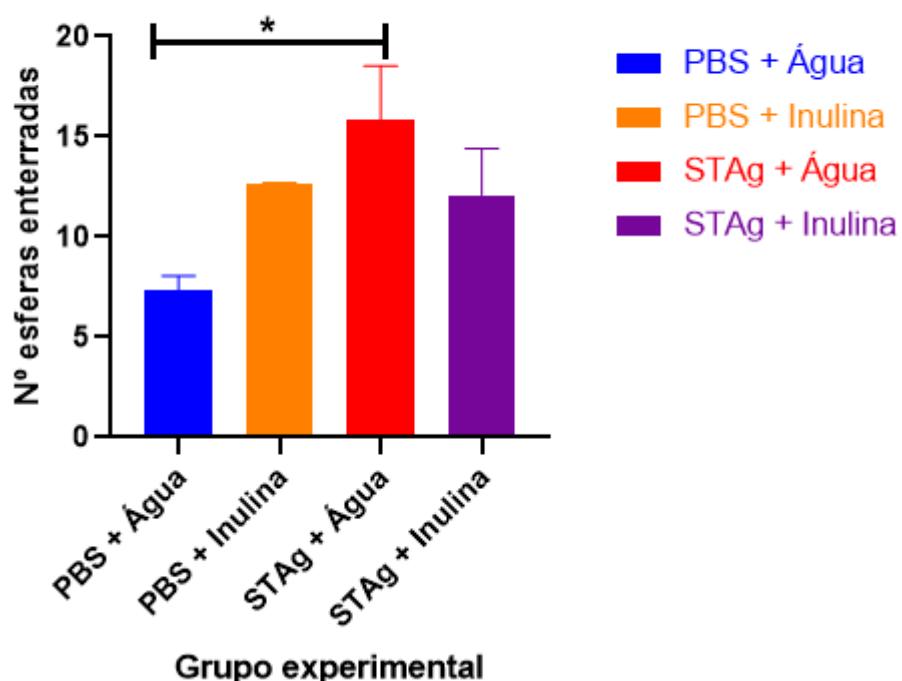


Figura 11: *One-way ANOVA* utilizando a média de esferas enterradas no final do teste (machos e fêmeas dos quatro grupos experimentais). * - p<0,05 na comparação entre os grupos indicados.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho nós analisamos os efeitos neuroprotetores da inulina sobre comportamentos do tipo compulsivos e repetitivos em animais provenientes de mães que foram desafiadas imunologicamente com STAg durante a gestação.

O teste comportamental de enterramento de esferas de vidro busca avaliar o comportamento do tipo compulsivo e repetitivo nos roedores. Esse tipo de comportamento está presente na sintomatologia de transtornos como o TOC, TEA e transtornos de ansiedade (DIXIT; SAHU; MISHRA, 2020). O roedor demonstra esse comportamento através do enterramento das esferas na maravalha e, quanto maior o percentual de enterramento, mais alterado está o comportamento em relação a grupos controle. No presente estudo, o teste foi conduzido durante 20 minutos, seguindo estudos que estabeleceram que 30 minutos seria o tempo máximo possível para resultados seguros, visto que quanto maior o tempo, mais chance o animal tem de acabar enterrando todas as esferas e influenciando o resultado do experimento (NJUNG'E; HANDLEY, 1991).

Como observado nos resultados, o grupo controle (PBS + Água) foi o que teve menor percentual de enterramento, indicando um padrão comportamental normal dos animais. Por outro lado, grupo STAg + Água apresentou a maior taxa de enterramento, como esperado, uma vez que já está bem estabelecido na literatura que a imunoativação maternal leva a alterações comportamentais na prole (DUARTE et al., 2025; HASSIB et al., 2023; MALKOVA et al., 2012; SPINI et al., 2021). Comparado a este grupo, o grupo que sofreu o desafio e foi tratado com inulina (STAg + Inulina) apresentou uma taxa menor de enterramento, mais significativo nas fêmeas, sugerindo um efeito protetor da inulina, que parece ter revertido pelo menos

parcialmente os efeitos deletérios causados pelo STAg. Porém, o grupo cujas mães não sofreram a imunoativação e recebeu o tratamento (PBS + Inulina) apresentou comportamento similar ao grupo STAg + Inulina e, comparado ao grupo controle, teve maior taxa de enterramento, indicando um efeito reverso da inulina nesse grupo, o que não era esperado. No estudo de Szewczyk e colaboradores (2023), a suplementação com inulina resultou em melhora significativa no comportamento e cognição de ratos Wistar (SZEWCZYK et al., 2023). No nosso estudo, o modelo animal utilizado foi o camundongo C57BLJ-6, o que pode ter sido um fator de diferença nos resultados do teste.

O estudo de Wang e colaboradores (2023) obteve resultado positivo utilizando a inulina como tratamento em camundongos na fase adulta que apresentam estresse crônico mínimo e imprevisível (CUMS), revertendo comportamentos do tipo compulsivo e repetitivo em comparação a animais não tratados e se assemelhando aos animais controle (WANG et al., 2023). A inulina utilizada no tratamento foi obtida através de raízes de chicória, com pureza de aproximadamente 90% e administrada na dieta dos animais, numa concentração de 0,037 g/kcal (WANG et al., 2023). No presente estudo, o tratamento com inulina foi administrado via gavagem e a concentração de inulina foi 10% em água destilada, o que pode ter sido um dos fatores a contribuir para o resultado não significativo no comportamento dos grupos tratados em relação a não tratados.

Outros fatores podem ter influenciado os resultados do teste comportamental. Em certo momento dos experimentos, o biotério passou por reforma, os animais foram realocados de sala e houve barulho durante esse período. Isso pode ter alterado o comportamento dos animais tanto na execução dos testes, quanto causado estresse nas fêmeas durante a gestação. O estudo de Caparros-Gonzalez e colaboradores concluiu que altos níveis de estresse durante a gestação, causado por fatores ambientais, pode causar alterações comportamentais nos filhos ao longo da vida (CAPARROS-GONZALEZ et al., 2021). Além disso, em certo momento entre a execução

dos testes, a maravalha, que é fornecida pelo REBIR, foi trocada. O material é utilizado nas gaiolas dos animais e como base para o enterramento das esferas no teste. Nos primeiros testes, a maravalha era composta de flocos grandes, que facilitavam o enterramento de objetos, porém foi trocada por uma mais fina com aspecto arenoso, o que dificultava para os animais o enterramento das esferas e elas terem 75% ou mais de sua superfície coberta, como exige o teste. As análises do experimento foram adaptadas a essa condição, analisando não só a superfície coberta da esfera, como o comportamento do animal de enterrar e desenterrar, a fim de padronizar uma forma de enterramento comum entre os animais que utilizaram a maravalha anterior e os que foram testados após a troca. Porém, a troca além de causar um potencial fator estressante, pode ter influenciado o resultado dos testes.

Embora tenhamos conduzido e analisado separadamente os experimentos em proles de machos e de fêmeas, a fim de obter um resultado comparativo entre gêneros, não tínhamos intenção de uma análise mais complexa e por isso não fizemos estadiamento do ciclo estral. Para as condições desse experimento, os resultados dos machos e das fêmeas foram bem semelhantes, como visto nos gráficos (figuras 9 e 10).

Em nossos experimentos, o desafio imunogênico com STAg no 16º dia de gestação também mostrou causar alterações comportamentais na prole, semelhante aos resultados obtidos por Spini e colaboradores (SPINI et al., 2021), porém os comportamentos foram do tipo repetitivos-compulsivos, acessados pelo teste de enterramento de esferas de vidros. A administração de inulina por gavagem na fase de lactação, nas condições do nosso experimento, mostrou efeito protetor apenas na prole fêmea cujas mães foram desafiadas com STAg, quando comparadas ao grupo STAg + Água.

6. CONCLUSÃO

A presente pesquisa permite concluir que o desafio imunogênico com STAg em mães durante a gestação causa alterações comportamentais na prole em idade adulta, para comportamentos do tipo repetitivo e compulsivo, verificado neste experimento através do teste comportamental de enterramento de esferas de vidro. Quanto ao tratamento, nas condições desse experimento, a inulina administrada via gavagem durante a fase de lactação, diminuiu o comportamento repetitivo apenas em um grupo experimental (STAg + Inulina x STAg + Água) na prole fêmea, necessitando talvez de ajustes na sua concentração em experimentos futuros. No entanto, com o estudo bibliográfico realizado, pode-se concluir que a modulação da microbiota, através da inulina e de outros prebióticos, pode se tornar um possível tratamento para certas desordens psíquicas.

7. REFERÊNCIAS

- ALONSO, J. et al. Treatment gap for anxiety disorders is global: Results of the World Mental Health Surveys in 21 countries. **Depression and Anxiety**, v. 35, n. 3, p. 195–208, 2018.
- ANGOA-PÉREZ, M. et al. Marble burying and nestlet shredding as tests of repetitive, compulsive-like behaviors in mice. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 82, p. 50978, 2013.
- APPLETON, J. The gut-brain axis: Influence of microbiota on mood and mental health. **Integrative Medicine (Boulder)**, v. 17, n. 4, p. 28–32, 2018.
- BENDRISS, G.; MACDONALD, R.; MCVEIGH, C. Microbial Reprogramming in Obsessive-Compulsive Disorders: A Review of Gut-Brain Communication and Emerging Evidence. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 15, 2023.
- 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, p. 1239–1285, 2021.
- BHATTARAI, Y.; MUNIZ PEDROGO, D. A.; KASHYAP, P. C. Irritable bowel syndrome: A gut microbiota-related disorder? **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 312, n. 1, p. G52–G62, 2016.
- BROCK, H.; RIZVI, A.; HANY, M. Obsessive-Compulsive Disorder. **Phobias: The Psychology of Irrational Fear**, p. 242–244, 2025.
- BROWN, E. M.; KENNY, D. J.; XAVIER, R. J. Gut Microbiota Regulation of T Cells During Inflammation and Autoimmunity. **Annual Review of Immunology**, v. 37, p. 599–624, 2019.
- CAPARROS-GONZALEZ, R. A. et al. Stress During Pregnancy and the Development of Diseases in the offspring: A Systematic-Review and Meta-Analysis. **Midwifery**, v. 97, n. January, p. 102939, 2021.
- CHRISTIAN MILANI, SABRINA DURANTI, FRANCESCA BOTTACINI, B. 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**, v. 81, n. 4, p. 1–67, 2017.

CHUDZIK, A. et al. Probiotics, prebiotics and postbiotics on mitigation of depression symptoms: Modulation of the brain–gut–microbiome axis. **Biomolecules**, v. 11, n. 7, 2021.

DE MIRANDA, A. S. et al. Dengue-3 encephalitis promotes anxiety-like behavior in mice.

Behavioural Brain Research, v. 230, n. 1, p. 237–242, 2012.

DIXIT, P. V.; SAHU, R.; MISHRA, D. K. Marble-burying behavior test as a murine model of compulsive-like behavior. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 102, p. 106676, 2020.

DOS SANTOS BRASIL, L.; RAYOL, M. E.; DA CONCEIÇÃO CAETANO SIQUEIRA, M. Covid-19: impact on the mental health of the population in times of pandemic, an integrative review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 16, p. e260101623988–e260101623988, 2021.

DUARTE, R. M. F. et al. Resveratrol prevents offspring's behavioral impairment associated with immunogenic stress during pregnancy. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 136, n. January, p. 1–7, 2025.

ESTES, M. L.; MCALLISTER, A. K. Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 772–777, 2016.

FERREIRA, F. R. et al. Impact of Season of Birth on Psychiatric Disorder Susceptibility and Drug Abuse Incidence in a Population from the Köppen Tropical Savanna Region of Brazil. **Neuropsychobiology**, v. 79, n. 2, p. 131–140, 2020.

GENEROSO, J. S. et al. The role of the microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric disorders. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 43, n. 3, p. 293–305, 2021.

GHEORGHE, C. E. et al. Focus on the essentials: tryptophan metabolism and the

- microbiome-gut-brain axis. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 48, p. 137–145, 2019.
- HASSIB, L. et al. Maternal microbiome disturbance induces deficits in the offspring's behaviors: a systematic review and meta-analysis. **Gut Microbes**, v. 15, n. 1, 2023.
- JAVAID, S. F. et al. Epidemiology of anxiety disorders: global burden and sociodemographic associations. **Middle East Current Psychiatry**, v. 30, n. 1, 2023.
- KELLY, J. R. et al. Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. **Journal of Psychiatric Research**, v. 82, p. 109–118, 2016.
- KENWOOD, M. M.; KALIN, N. H.; BARBAS, H. The prefrontal cortex, pathological anxiety, and anxiety disorders. **Neuropsychopharmacology**, v. 47, n. 1, p. 260–275, 2022.
- LABETOULLE, M. et al. How gut microbiota may impact ocular surface homeostasis and related disorders. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 100, n. October 2023, p. 101250, 2024.
- LE BASTARD, Q. et al. The effects of inulin on gut microbial composition: a systematic review of evidence from human studies. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 39, n. 3, p. 403–413, 2020.
- LEITE NUNES, S. B. Microbiota do leite materno: origem e benefícios. **Universidade de Coimbra**, 2014.
- LU, J. et al. Effects of Intestinal Microbiota on Brain Development in Humanized Gnotobiotic Mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2018.
- MADY, E. A. et al. Impact of the mother's gut microbiota on infant microbiome and brain development. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 150, n. April, p. 105195, 2023.
- MAHJANI, B. et al. Genetics of obsessive-compulsive disorder. **Psychological Medicine**, v. 51, p. 2247–2259, 2021.
- MAIUOLO, J. et al. The Contribution of Gut Microbiota–Brain Axis in the Development of

Brain Disorders. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, n. March, 2021.

MALKOVA, N. V. et al. Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, n. 4, p. 607–616, 2012.

MANGIOLA, F. et al. Gut microbiota in autism and mood disorders. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 1, p. 361–368, 2016.

MAYER, E. A.; NANCE, K.; CHEN, S. The Gut – Brain Axis. p. 439–453, 2022.

MONROE, J. M.; BUCKLEY, P. F.; MILLER, B. J. Meta-Analysis of Anti-Toxoplasma gondii IgM Antibodies in Acute Psychosis. **Schizophrenia Bulletin**, v. 41, n. 4, p. 989–998, 2015.

MURPHY, T. K.; EVELYN STEWART, S.; OBREGON, D. Obsessive compulsive disorder. **The Medical Basis of Psychiatry: Fourth Edition**, p. 169–193, 2016.

NARROW, W. E. ET AL. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. [s.l.: s.n.]. v. 5

NJUNG'E, K.; HANDLEY, S. L. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 38, n. 1, p. 63–67, 1991.

NYANGAHU, D. D.; JASPAN, H. B. Influence of maternal microbiota during pregnancy on infant immunity. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 198, n. 1, p. 47–56, 2019.

OUABBOU, S. et al. Inflammation in Mental Disorders: Is the Microbiota the Missing Link? **Neuroscience Bulletin**, v. 36, n. 9, p. 1071–1084, 2020.

PENDYALA, G. et al. Maternal Immune Activation Causes Behavioral Impairments and Altered Cerebellar Cytokine and Synaptic Protein Expression. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 7, p. 1435–1446, 2017.

RADFORD-SMITH, D. E. et al. Modifying the maternal microbiota alters the gut–brain metabolome and prevents emotional dysfunction in the adult offspring of obese dams.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 119, n. 9, p. 1–12, 2022.

RUNGE, K. et al. Deep clinical phenotyping of patients with obsessive-compulsive disorder: an approach towards detection of organic causes and first results. **Translational Psychiatry**, v. 13, n. 1, 2023.

SANIKHANI, N. S. et al. The Effect of Lactobacillus casei Consumption in Improvement of Obsessive–Compulsive Disorder: an Animal Study. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, n. 4, p. 1409–1419, 2020.

SINGH, A.; ANJANKAR, V. P.; SAPKALE, B. Obsessive-Compulsive Disorder (OCD): A Comprehensive Review of Diagnosis, Comorbidities, and Treatment Approaches. **Cureus**, v. 15, n. 11, p. 1–6, 2023.

SPINI, V. 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, 2021.

STEIN, D. J. et al. Obsessive–compulsive disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 1–21, 2019.

SZEWCZYK, A. et al. The Effect of a Diet Enriched with Jerusalem artichoke, Inulin, and Fluoxetine on Cognitive Functions, Neurogenesis, and the Composition of the Intestinal Microbiota in Mice. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 45, n. 3, p. 2561–2579, 2023.

TAYLOR, G. T.; LERCH, S.; CHOURBAJI, S. Marble burying as compulsive behaviors in male and female mice. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 77, n. 3, p. 254–260, 2017.

VEALE, D.; ROBERTS, A. Obsessive-compulsive disorder. **BMJ (Online)**, v. 348, n. April, p. 1–6, 2014.

WANG, L. et al. Inulin Attenuates Blood-Brain Barrier Permeability and Alleviates Behavioral Disorders by Modulating the TLR4/MyD88/NF-κB Pathway in Mice with Chronic

Stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, n. 36, p. 13325–13337, 2023.

ZACCARI, V. et al. Narrative Review of COVID-19 Impact on Obsessive-Compulsive Disorder in Child, Adolescent and Adult Clinical Populations. **Frontiers in Psychiatry**, v. 12, n. May, 2021.

ZHU, F.; TU, H.; CHEN, T. The Microbiota–Gut–Brain Axis in Depression: The Potential Pathophysiological Mechanisms and Microbiota Combined Antidepressant Effect. **Nutrients**, v. 14, n. 10, 2022.