



## EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE RATOS *WISTAR-KYOTO* COM LEITE FERMENTADO PROBIÓTICO SOBRE O EIXO INTESTINO-CÉREBRO COM ÊNFASE NO PADRÃO DE SONO E RESPOSTA AO ESTRESSE

Samara Máximo de Freitas, Milca Abda de Moraes, Beatriz Franco, Luciana Carvalho Fino, Dra. Adriane Elisabete Costa Antunes, Dra. Andrea Maculano Esteves.

### INTRODUÇÃO

Sabe-se, atualmente, que o padrão de sono tem grande influência na homeostase corporal em diversos aspectos. Estudos apontam que a privação de sono pode causar, dentre tantas alterações, mudanças na microbiota intestinal (ZHANG et al., 2017; LOPES, 2013; POROYOKO et al., 2016). Em contrapartida, tem sido descrito que a microbiota intestinal age no Sistema Nervoso Central (SNC) através do eixo intestino-cérebro, em funções como o comportamento, humor, memória e aprendizagem, através de substâncias neuro ativas, derivadas do lúmen intestinal, que são capazes de penetrar a mucosa e serem transportados pelo sangue, atravessando a barreira hematoencefálica, ou mesmo podem afetar a excitabilidade dos neurônios do Sistema Nervoso Entérico (SNE), influenciando o SNC e modulando a secreção de alguns neurotransmissores. Estudos com humanos apontaram uma melhora na resposta a estímulos emocionais negativos de mulheres suplementadas com probióticos, e um estudo com ratos *Germ free* tiveram uma melhora na responsividade ao estresse após a colonização do intestino (ZORZO, 2017; MEYER; TILLISCH; GUPTA, 2015; FURTADO; SILVA; WALFALL, 2018).

Além das funções citadas, estudos têm apontado uma relação entre a suplementação com probióticos e o padrão de sono. Algumas pesquisas observaram melhora na qualidade de sono após suplementação da cepa *Lactobacillus gasseri* CP2305, e melhora em parâmetros do sono após suplementação com *Lactobacillus casei Shirota*, ambos estudos realizados em humanos estudantes de medicina (MATENCHUK; MANDHANE; KOZYRSKYJ, 2020; TAKADA et al., 2017). Levando em consideração os benefícios dos probióticos, esse estudo verificou o seu efeito no padrão de sono de animais submetidos a um estresse (privação do sono *REM*).

### MATERIAIS E MÉTODOS



#### Modelo Animal

- Rato *wistar-kyoto*;
- Machos, 60 dias de idade;
- Aprovado pelo CEUA sob número 5261-1/2019.



#### Elaboração do Leite Fermentado

- Ingredientes: maltodextrina, frutose, leite em pó, *Whey Protein*, água, sorbato, suco de romã, corante.
- Culturas: cultura *starter S. thermophilus* e cepa probiótica *B. animalis* BB12.



#### Suplementação

- Grupo Controle: 2 animais, gavagem com água;
- Grupo Suplementado: 4 animais, gavagem com leite fermentado probiótico;
- 30 dias de suplementação, 2mL por dia.



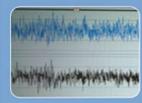
#### Análises bioquímicas

- Fezes coletadas antes e após privação;
- Análise de bactérias totais e probióticos ingeridos;
- Método *qPCR*.



#### Cirurgia de Implantação de Eletrodos

- Anestesia Isoflurano 2%;
- Implantação de 4 parafusos de aço inoxidável na dura-máter e implantação de um par de eletrodos;
- Analgesia pós operatória: meloxicam subcutâneo 1x por dia, durante 3 dias.



#### Polissonografia

- Polígrafo *Nihon-Koden QP-223*;
- Software *REM Logic* para quantificação dos parâmetros;
- Análise basal de 24h e final de 48h;
- Parâmetros: tempo total de sono, eficiência de sono, vigília, número de despertares sono de ondas lentas e sono *REM*.



#### Privação de Sono *REM*

- Método de plataforma única (NUNES; TUFIK, 1994);
- Plataformas imersas na água até 1cm da sua borda;
- 48h de privação.



#### Análises estatísticas

- Média e desvio padrão;
- Gráficos plotados no programa *GraphPad Prism 5*.

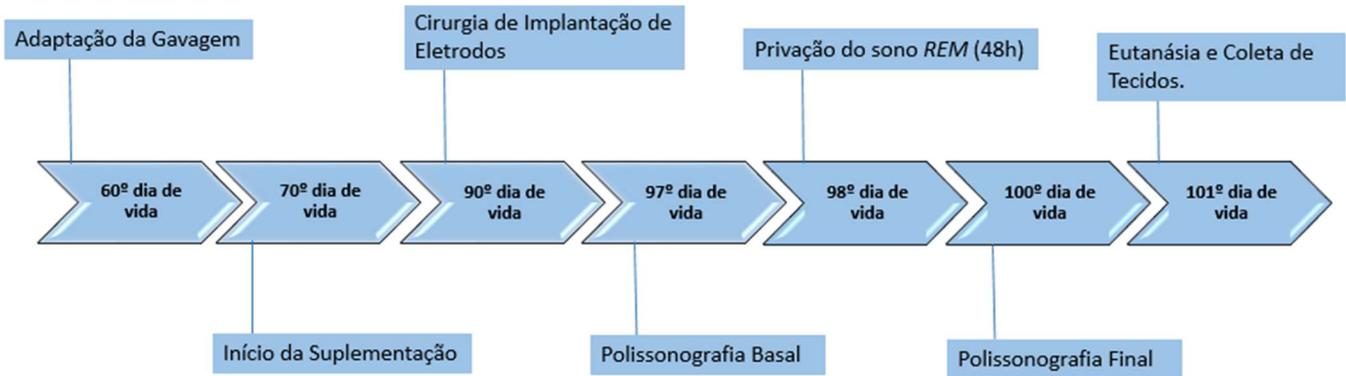


Figura 1. Desenho Experimental

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

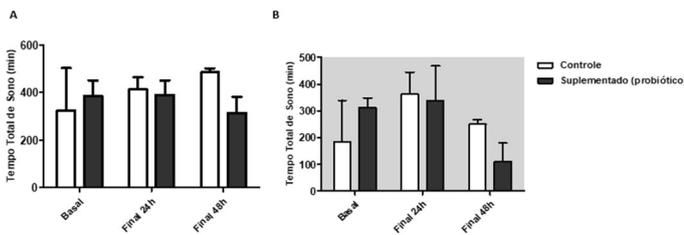


Figura 2. Tempo Total de sono (TTS) em minutos dos grupos Controle (n=2) e Suplementado (n=4). **A)** Ciclo Claro (6h-18h). **B)** Ciclo Escuro (18h-6h). Os dados foram expressos como média ± desvio padrão.

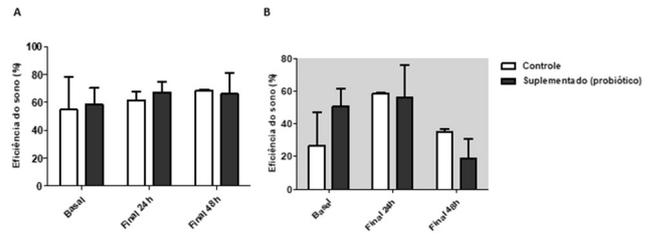


Figura 3. Eficiência do Sono (ES) em porcentagem dos grupos Controle (n=2) e Suplementado (n=4). **A)** Ciclo Claro (6h-18h). **B)** Ciclo Escuro (18h-6h). Os dados foram expressos como média ± desvio padrão.

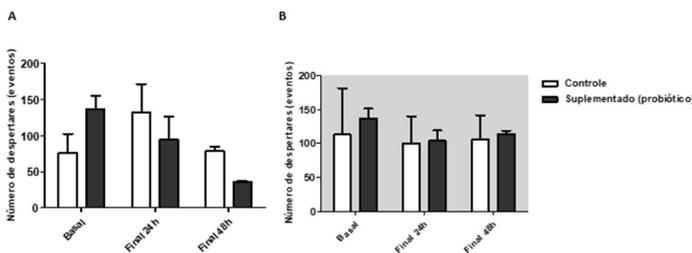


Figura 4. Número de Despertares (ND) em número de eventos dos grupos Controle (n=2) e Suplementado (n=4). **A)** Ciclo Claro (6h-18h). **B)** Ciclo Escuro (18h-6h). Os dados foram expressos como média ± desvio padrão.

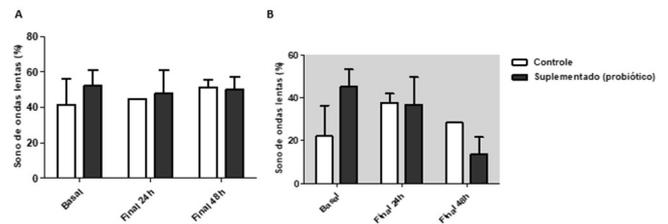
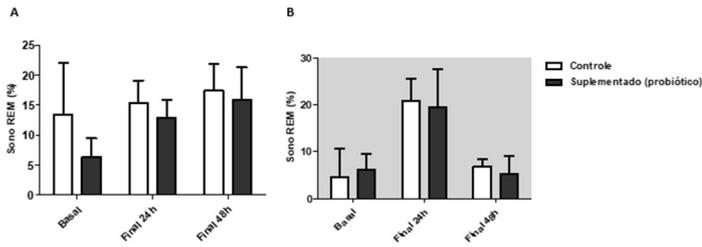
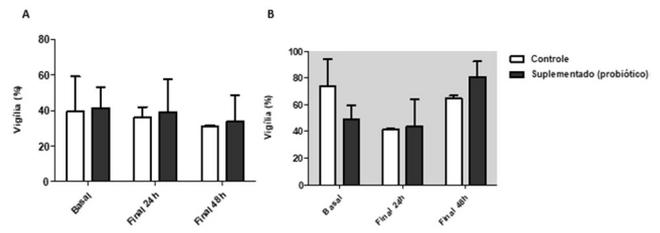


Figura 5. Sono de Ondas Lentas (SOL) em porcentagem dos grupos Controle (n=2) e Suplementado (n=4). **A)** Ciclo Claro (6h-18h). **B)** Ciclo Escuro (18h-6h). Os dados foram expressos como média ± desvio padrão.



**Figura 6.** Sono de REM (SR) em porcentagem dos grupos Controle (n=2) e Suplementado (n=4). **A)** Ciclo Claro (6h-18h). **B)** Ciclo Escuro (18h-6h). Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 7.** Vigília (VG) em porcentagem dos grupos Controle (n=2) e Suplementado (n=4). **A)** Ciclo Claro (6h-18h). **B)** Ciclo Escuro (18h-6h). Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

De acordo com os gráficos acima apresentados, no presente estudo podemos verificar que, no ciclo escuro, no momento basal, os animais do grupo suplementado apresentaram maior TTS (Figura 2), ES (Figura 3) e SOL (Figura 5), quando comparado aos valores normalmente demonstrados na literatura (ESTEVEZ et al, 2013). Além disso, foi visto um aumento do TTS em ambos os grupos tanto no ciclo claro, quanto no ciclo escuro, nas primeiras 24h após privação; porém nas 48h de recuperação, houve uma redução do TTS de ambos os grupos no ciclo escuro de 48h, uma provável similaridade ao que foi demonstrado no estudo de DISPERSYN et. al. (2017), que o rebote de sono após a privação foi mais acentuado no ciclo claro, por ser um período em que os roedores costumam dormir, sendo atenuado no ciclo escuro, respeitando o ciclo circadiano.

Houve também uma redução na média do número de despertares (Figura 4) nos animais suplementados nas primeiras 24h pós privação no ciclo claro e uma redução ainda maior após 48h. Esse resultado foi semelhante ao de um estudo realizado com camundongos privados do sono por 24h, no qual verificou-se a redução do número de despertares desses animais, porém somente nas primeiras 24h de recuperação pós privação (DISPERSYN et. al., 2017). A diferença entre ambos pode ser explicada tanto pelo tempo de privação, que foi maior no presente estudo, quanto pela suplementação com probióticos.

Foi possível observar também em ambos os grupos, que os animais levaram cerca de um dia e meio para se recuperarem da privação de sono, ou seja, houve um aumento do sono REM nesse período pós privação, porém normalizou no ciclo escuro do período final de 48h. Em relação ao SOL, não houve um aumento no período final de 48h, como era esperado e como é descrito no rebote de sono. Fernandes (2006) aponta que na noite seguinte à privação do sono, ocorre o aumento do sono REM, e na segunda noite verifica-se o aumento do NREM, voltando a sua arquitetura normal, somente após a terceira noite. Porém, tratando-se de resultados parciais, ainda podem haver alterações nesses dados. Ademais, ao contrário do observado no estudo de DISPERSYN et. al. (2017), no presente estudo não foi encontrado um aumento na média do SOL no ciclo claro após 48h de privação, em relação a análise basal. No ciclo escuro, observamos aumento na média do SOL nas 48h após privação do sono, apenas no grupo controle.



Alguns estudos têm mostrado a relação que pode ser estabelecida entre o sono e a microbiota intestinal. Pesquisas em animais tem demonstrado a privação e a redução do tempo de sono tem consequências na microbiota intestinal, como a redução na variedade das espécies. Ademais, outra pesquisa com humanos demonstrou que a suplementação com a cepa probiótica *Lactobacillus gasseri* CP2305, levou a uma melhora na qualidade do sono dos estudantes de medicina submetidos à intervenção, especialmente relacionada a redução da latência do sono (MATENCHUK; MANDHANE; KOZYRSKYJ, 2020).

Outros estudos com humanos, fizeram essa relação, apresentando melhora na qualidade de sono dos participantes após a suplementação; e mais especificamente, a suplementação com a bactéria probiótica *Lactobacillus casei Shirota* em uma pesquisa com estudantes de medicina, aliviou a sonolência, suprimiu o prolongamento da latência do sono, impediu a redução do SOL e proporcionou um maior poder delta durante o primeiro ciclo de sono, dentre outras coisas, após serem submetidos à um estímulo estressor (MAROTTA et. al., 2019; TAKADA et al., 2017).

Todavia, no presente estudo, não foi possível verificar esses efeitos até o momento, considerando o baixo n amostral atual, o qual impossibilitou uma análise estatística mais detalhada e dificultou o estabelecimento da relação proposta entre a suplementação com probióticos e o padrão de sono.

## CONCLUSÃO

Devido ao baixo n amostral, ainda não é possível concluir os resultados observados até o momento. Nesse contexto, não foi possível observar a relação da suplementação de probióticos como um possível fator protetor ao estresse (privação de sono). No entanto, com os dados coletados até aqui, foi verificado o aumento da média do sono *REM* após 24h e 48h da privação de sono no ciclo claro, e após 24h no ciclo escuro, em ambos os grupos. Possivelmente, esse resultado indique que os animais precisaram de mais de 24h para se recuperarem do estresse causado pela privação de sono. Vale lembrar que os resultados ainda são parciais e que podem sofrer alterações.

## APOIO

Projeto financiado pelo PIBIC/CNPq.

## REFERÊNCIAS

DISPERSYN, G.; SAUVET, F.; GOMEZ-MERINO, D.; CIRET, S.; DROGOU, C.; LEGER, D.; GALLOPIN, T.; CHENNAOUI, M. The homeostatic and circadian sleep recovery responses after total sleep deprivation in mice. **Journal Of Sleep Research**, [S.L.], v. 26, n. 5, p. 531-538, 20 abr. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jsr.12541>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jsr.12541>. Acesso em: 09 set. 2020.



ESTEVES AM, LOPES C, FRUSSA-FILHO R, FRANK MK, CAVAGNOLLI D, ARIDA RM, et al. Spontaneously hypertensive rats: possible animal model of sleep-related movement disorders. *Journal of motor behavior*. 2013;45(6):487-93.

FERNANDES, R. M. F. O SONO NORMAL. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 2, p. 157-168, 30 jun. 2006. Universidade de São Paulo, Agência USP de Gestão da Informação Acadêmica (AGUIA). <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v39i2p157-168>. FLECKNELL P. *Laboratory Animal Anaesthesia*. 3ª ed. Elsevier 2009.

FURTADO, C. C.; SILVA, A. L. B.; WALFALL, A. M. Psicobióticos: Uma Ferramenta para o Tratamento no Transtorno da Ansiedade e Depressão? **Revista Unilus Ensino e Pesquisa**, Santos, v. 15, n. 40, p.137-151, set. 2018.

LOPES, C. A., Taxonomia de *Ralstonia solanacearum*. **The Official Journal Of São Paulo Pathology Association**. São Paulo. fev. 2013.

MAROTTA, A.; SARNO, E.; CASALE, A.; PANE, M.; MOGNA, L.; AMORUSO, A.; FELIS, G. E.; FIORIO, M.. Effects of Probiotics on Cognitive Reactivity, Mood, and Sleep Quality. **Frontiers In Psychiatry**, [S.L.], v. 10, n. 0, p. 1-11, 27 mar. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpsy.2019.00164>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsy.2019.00164/full>. Acesso em: 31 ago. 2020.

MATENCHUK, B. A.; MANDHANE, P. J.; KOZYRSKYJ, A. L.. Sleep, circadian rhythm, and gut microbiota. **Sleep Medicine Reviews**, [S.L.], v. 53, p. 1-23, out. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smrv.2020.101340>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087079220300836?via%3Dihub>. Acesso em: 08 set. 2020.

MAYER, E.A.; TILLISCH, K.; GUPTA, A. Gut/brain axis and the microbiota. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 125, n. 3, p.926-938, 17 fev. 2015. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci76304>. Disponível em: <https://dm5migu4zj3pb.cloudfront.net/manuscripts/76000/76304/cache/76304.2-20150220094408-covered-253bed37ca4c1ab43d105aefdf7b5536.pdf>. Acesso em: 22 maio 2019.

NUNES, G. J.; TUFIK, S. Validation of the modified multiple platform method (MMP) of paradoxical sleep deprivation in rats. *Sleep Research*, v. 22(Suppl), p. 339, 1994.

TAKADA, M. et al. Beneficial effects of Lactobacillus casei strain Shirota on academic stress-induced sleep disturbance in healthy adults: a double-blind, randomised, placebo-controlled trial. **Beneficial Microbes**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.153-162, 26 abr. 2017. Wageningen Academic Publishers. <http://dx.doi.org/10.3920/bm2016.0150>.

ZHANG, S. L. et al. Human and rat gut microbiome composition is maintained following sleep restriction. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 114, n. 8, p.1564-1571, 8 fev. 2017. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1620673114>.

ZORZO, R. A. **Impacto do Microbioma Intestinal no Eixo Cérebro-Intestino**. *International Journal of Nutrology*, 1(10), 298-305, 2017.