

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

JOSIMAR GRASSI PEREIRA

**TRATAMENTO COM PROBIÓTICO ALTERA OS NÍVEIS DE CREB E
TRKB EM CÓRTEX FRONTAL DE RATAS SUBMETIDAS À
PRIVAÇÃO MATERNA**

CRICIÚMA

2022

JOSIMAR GRASSI PEREIRA

**TRATAMENTO COM PROBIÓTICO ALTERA OS NÍVEIS DE CREB E
TRKB EM CÓRTEX FRONTAL DE RATAS SUBMETIDAS À
PRIVAÇÃO MATERNA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.a Dra. Gislaine Zilli Réus

CRICIÚMA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

P436t Pereira, Josimar Grassi.

Tratamento com probiótico altera os níveis de CREB e trkB em córtex frontal de ratas submetidas à privação materna / Josimar Grassi Pereira. - 2022.

65 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2022.

Orientação: Gislaine Zilli Réus.

1. Probióticos - Efeitos colaterais. 2. Antidepressivos - Efeitos colaterais. 3. Cetamina - Efeitos colaterais. 4. Transtorno depressivo maior - Tratamento. 5. Privação materna. 6. Receptor trkB. T. Título.

CDD 23. ed. 615.1



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – N° 398

Com início às 14h (quatorze horas) do dia vinte e quatro de agosto de 2022 (dois mil e vinte e dois), realizou-se, via ferramenta digital *Google Meet*, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **JOSIMAR GRASSI PEREIRA**, sob a orientação da **Profa. Dra. Gislaíne Zilli Réus**, intitulada “**TRATAMENTO COM PROBIÓTICO ALTERA OS NÍVEIS DE CREB E TRKB EM CÓRTEX FRONTAL DE RATAS SUBMETIDAS À PRIVAÇÃO MATERNA**”. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, Profa. Dra. Cinara Ludvig Gonçalves (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, e Profa. Dra. Zuleide Maria Ignácio (Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: APROVADO, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 16h (dezesseis horas), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Emilio Luiz Streck, Coordenador do Programa. Criciúma, 24 (vinte e quatro) de agosto de 2022 (dois mil e vinte e dois).

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

Fernanda Nunes Peruchi
Assistente Administrativo

FOLHA INFORMATIVA

A Dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver com adaptações descritas na Resolução n. 7/2015 do Colegiado e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Psiquiatria Translacional pertencente ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da UNESC.

AGRADECIMENTOS

A prof. Dra. Gislaine Zilli Réus, pela confiança depositada em mim ao longo desta jornada. Pela amizade, orientação e acima de tudo por ser um exemplo e inspiração em todos os aspectos de sua vida.

A Monela Budni pela amizade, pelo incentivo e suporte durante todos estes anos que estamos trabalhando juntos.

A aluna de iniciação científica Catharina de Bem Ribeiro por estar junto comigo, me auxiliando desde o início do mestrado.

Aos colegas do Laboratório de Psiquiatria Translacional pelos momentos de descontração e ajuda indispensável nos experimentos. Em especial: Alex, Camila, Caion, Larissa, Laura, Monique e Nicolý.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde por compartilharem seus conhecimentos comigo e, pelo incentivo a pesquisa e confiança depositada.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pelo crescimento conjunto que tivemos nessa jornada.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos (Código de financiamento 001) para a realização do mestrado e por seu papel imprescindível para o fomento e divulgação de ciência no Brasil.

Aos amigos e familiares pelos pequenos gestos e detalhes do dia a dia que fazem a diferença e ajudaram a tornar este caminho mais leve e produtivo.

RESUMO

O transtorno depressivo maior (TDM) é o transtorno de humor mais prevalente no mundo, afetando milhões de pessoas de diferentes culturas e classes sociais, produzindo impactos relevantes nas relações afetivas, sociais e no ambiente de trabalho. A maioria dos medicamentos disponíveis para tratar este transtorno agem na neurotransmissão das monoaminas, aumentando a sua concentração na fenda sináptica. Entretanto, muitos dos antidepressivos utilizados atualmente, demoram semanas para exibirem os seus efeitos, e alguns indivíduos não respondem ao tratamento tornando a busca por estratégias alternativas um alvo científico interessante, especialmente com enfoque na descoberta de substâncias que apresentem um efeito mais rápido e efetivo, inclusive para pacientes refratários aos tratamentos tradicionais. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento com escitalopram (antidepressivo clássico), cetamina (antagonista glutamatérgico) e probiótico *Bifidobacterium infantis* em ratos Wistar adultos de 61 dias pós-natais (DPN) de ambos os sexos, submetidos ao modelo animal de privação materna (PM). Após a PM, controles (não privados) e privados foram divididos nos seguintes grupos: 1) Não privado + Sal; 2) Privado + Sal; 3) Privado + Escitalopram; 4) Privado + Cetamina; e 5) Privado + Probiótico. Além disso, os mesmos grupos foram estratificados por sexo. A cetamina foi administrada na dose de 15 mg/kg por via intraperitoneal duas vezes por semana. O escitalopram foi administrado na dose de 10 mg/kg por gavagem, uma vez ao dia. O probiótico *Bifidobacterium infantis* foi administrado por gavagem na dose 1×10^{10} de unidades formadoras de colônia (UFC) diluído em 100 mL de água uma vez ao dia. Os tratamentos foram realizados durante 50 dias. Animais de ambos os sexos foram submetidos a eutanásia para remoção do córtex frontal (CF) e hipocampo, e posterior análise dos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), do receptor tropomiosina quinase B (TrkB) e da proteína de ligação responsiva a adenosina 3,5-monofosfato cíclico (CREB). Os resultados demonstraram que houve uma resposta dependente do sexo com elevação dos níveis de TrkB no CF de fêmeas tratadas com *Bifidobacterium infantis*, acompanhada por uma redução nos níveis de CREB no CF das fêmeas expostas a PM e tratadas com cetamina ou *Bifidobacterium infantis*. Não houve alterações nos demais grupos e estruturas. Estes resultados demonstraram que os possíveis efeitos antidepressivos exibidos por *Bifidobacterium infantis* em outros estudos podem estar relacionados com os níveis de TrkB no CF de indivíduos do sexo feminino, indicando que tratamentos exerçam algum efeito na regulação desta proteína e podem ser utilizados como alvo terapêutico para o TDM

Palavras-chave: Probiótico. Cetamina. Antidepressivo. Neurotrofinas. TrkB. Privação Materna. Transtorno Depressivo Maior.

ABSTRACT

Major depressive disorder (MDD) is the most prevalent mood disorder in the world, affecting millions of people in different cultures and social classes. Producing relevant impacts on affective, social relationships, and the work environment. Most drugs available to treat this disorder act on the neurotransmission of monoamines, increasing their concentration in the synaptic cleft. However, many of the antidepressants currently used take weeks to have effects, and some individuals do not respond to treatment, making the search for alternative strategies an interesting scientific target, especially with a focus on finding substances that have a faster and more effective effect, especially for patients refractory to traditional treatments. The aim of this study was to evaluate the effects of the treatment with escitalopram (classical antidepressant), ketamine (glutamatergic antagonist), and probiotic *Bifidobacterium infantis* in 61 postnatal days (PND) Wistar adult rats of both sexes, submitted to an animal model of maternal deprivation (MD). After the MD protocol, controls (non-deprived) and deprived rats were divided into the following groups: 1) Non-deprived + Sal; and 2) Deprived + Sal; 3) Deprived + Escitalopram; 4) Deprived + Ketamine; and 5) Deprived + Probiotic. In addition, the same groups were stratified by sex. 15mg/kg of intraperitoneal Ketamine was administered twice a week. Escitalopram was administered for oral gavage at a dose of 10 mg/kg once daily. The probiotic *Bifidobacterium infantis* was administered for oral gavage at a dose of 1×10^{10} of colony forming unit (CFU) diluted in 100 mL of water once a day. The treatments were carried out for 50 days. Animals of both sexes were euthanized for removal of the frontal cortex (FC) and hippocampus, and subsequent analysis of the levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), tropomyosin receptor kinase B (TrkB), and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein (CREB). The results demonstrated that there was a sex-dependent response with elevation of TrkB levels in the FC of females treated with *Bifidobacterium infantis*, accompanied by a reduction in CREB levels in the FC of females exposed to MD and treated with saline, ketamine or *Bifidobacterium infantis*. There were no changes in the other groups and structures. These results showed that the possible antidepressant effects exhibited by *Bifidobacterium infantis* in other studies may be related to the levels of TrkB in the FC of female subjects, indicating that treatments that exert some effects on the regulation of this protein can be used as a therapeutic target for MDD.

Keywords: Probiotic. Ketamine. Antidepressant. Neurotrophins. TrkB. Maternal Deprivation. Major Depressive Disorder.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Imagens representativas dos níveis de BDNF TrkB e CREB 61DPN.....	31
Figura 2 - Efeitos da privação materna e do tratamento com cetamina, escitalopram e probiótico nos níveis de BDNF.....	32
Figura 3 - Efeitos da privação materna e do tratamento com cetamina, escitalopram e probiótico nos níveis de TrkB.....	33
Figura 4 - Efeitos da privação materna e do tratamento com cetamina, escitalopram e probiótico nos níveis de CREB.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT - 5-hidroxitriptamina, também chamada de Serotonina

ADT - Antidepressivos Tricíclicos

AGCC - Ácidos Graxos de Cadeia Curta

AMPA - Ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico

BDNF - Fator Neurotrófico-Derivado do Cérebro

BHE - Barreira Hematoencefálica

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

CF - Córtex Frontal

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CREB - Proteína de Ligação Responsiva a Adenosina 3,5-monofosfato Cíclico

CRH - Hormônio Liberador de Corticotrofina

DAMPs - Padrões Moleculares Associados a Danos

DPN - Dias Pós-Natal

GABA - Ácido gama-aminobutírico

NGF - Fator de Crescimento Nervoso

NT-4 - Neurotrofina-4

HPA - Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

HSP - Proteína de Choque Térmico

IL-10 - Interleucina-10

IL-1 β - Interleucina-1*Beta*

IL-6 - Interleucina-6

IL-10 - Interleucina-10

IMAO - Inibidores da Enzima Monoaminaoxidase

ISRS - Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina

iGluR - Receptores Ionotrópicos de Glutamato

mGluR - Receptores Metabotrópicos de Glutamato

NF- κ B - Fator de Transcrição Nuclear kappa B

NLRP3 - Receptor do tipo NOD3

NMDA - N-metil-D-aspartato

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAMPs - Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PM - Privação Materna

RNA_m - Ácido ribonucleico mensageiro ou RNA mensageiro
SBN_eC - Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento
SNA - Sistema Nervoso Autônomo
SNC - Sistema Nervoso Central
SNE - Sistema Nervoso Entérico
SOD - Superóxido Dismutase
TDM - Transtorno Depressivo Maior
TNF- α - Fatores de Necrose Tumoral *Alfa*
TrkB - Receptor Tropomiosina Quinase B
UFC - Unidade Formadora de Colônia
UNESC - Universidade do Extremo Sul Catarinense

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR.....	13
1.2 RELAÇÃO ENTRE PRIVAÇÃO MATERNA E O TDM.....	17
1.3 EIXO MICROBIOTA INTESTINO E CÉREBRO	19
1.4 ESCITALOPRAM, CETAMINA, PROBIÓTICO E TDM	21
1.5 NEUROTROFINAS.....	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 METODOLOGIA	28
3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS.....	28
3.2 ANIMAIS	28
3.3 PROTOCOLO DE PM E TRATAMENTOS.....	28
3.4 ANÁLISE DE PROTEÍNAS POR <i>WESTERN BLOT</i>	29
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4 RESULTADOS	31
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXO I - CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	58

1 INTRODUÇÃO

1.1. TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR

De acordo com a organização mundial da saúde (OMS), o transtorno depressivo maior (TDM) é mais prevalente nas mulheres e atinge em torno de 4,4% da população mundial, o que representa um contingente de aproximadamente 322 milhões de indivíduos afetados (WHO, 2017). O Brasil, é o segundo país com maior prevalência (5,8% da população) de casos de TDM nas Américas, o que torna este transtorno uma emergência médica importante no âmbito nacional (WHO, 2017). O TDM pode ser diagnosticado quando pelo menos cinco sintomas característicos estiverem presentes concomitantemente por pelo menos duas semanas, sendo obrigatório que o indivíduo apresente humor deprimido (caracterizado por aparente tristeza ou desesperança) e/ou perda do interesse ou prazer nas atividades cotidianas (DSM-5, 2014). Também podem estar presentes perda ou ganho de peso acima de 5% do peso corporal em um mês, sem uma dieta específica para tais fins, quadros de insônia ou hipersonia (sonolência diurna excessiva), agitação ou retardo psicomotor, fadiga, sentimento de inutilidade, culpa excessiva, falta de atenção, pensamento recorrente de morte e ideação suicida (Otte et al., 2016; WHO, 2022). Estes sintomas são característicos do TDM quando associados com prejuízos sociais e profissionais destes indivíduos e quando não são decorridos em resposta a efeitos colaterais da ingestão de substâncias ou de alguma condição médica preexistente (DSM-5, 2014).

Tendo em vista a diversidade de sintomas envolvidos neste transtorno, não surpreende o fato que esta condição apresente diversos impactos negativos na vida, e na função social dos indivíduos acometidos. Diversos estudos têm demonstrado que o TDM impacta negativamente o desempenho escolar e a vida profissional (Liu et al., 2020), diminuindo a produtividade e assiduidade no trabalho (Doran e Kinchin, 2019; Johnston et al., 2019; Volz et al., 2022), trazendo impactos econômicos para empregados, bem como empregadores (Kupferberg et al., 2016; Chow et al., 2019). Atingindo todos os sexos, idades e camadas sociais, o TDM também exerce impactos negativos nos núcleos familiares e na habilidade de participar em comunidade (Otte et al., 2016; WHO, 2022). Além disso, em indivíduos com TDM há um aumento de até 1,8 vezes na taxa de mortalidade, reduzindo a expectativa de vida em até 10 anos nessa população, principalmente devido as altas taxa de suicídio, que pode ser 20 vezes maiores em indivíduos com TDM do que na população em geral, representando uma média de mais de 800 mil mortes por ano (Chesney et al., 2014; WHO, 2021). Além do mais,

tem sido evidenciado que o TDM está envolvido com aparecimento de outras doenças ou comorbidades, incluindo sobrepeso e obesidade, diabetes, artrite reumatoide, falência cardíaca e doenças neurodegenerativas (Knol et al., 2006; Réus et al., 2016a; Celano et al., 2018; Réus et al., 2019; Vallerand et al., 2019; Wang et al., 2019).

O TDM é um transtorno multifatorial e diversas hipóteses têm sido levantadas para tentar elucidar os fatores envolvidos no estabelecimento do TDM. A mais conhecida é a hipótese da deficiência das monoaminas. Contudo outros componentes como alterações no eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), aumento da inflamação, fatores genéticos e epigenéticos, bem como alterações na plasticidade cerebral e mudanças estruturais e funcionais no encéfalo têm sido apontados como contribuintes na miríade de sintomas presentes no TDM (Fakhoury, 2015; Otte et al., 2016; Malhi e Mann, 2018).

Na hipótese monoaminérgica, ocorre a depleção dos níveis dos neurotransmissores dopamina, noradrenalina e serotonina (5-HT) na fenda sináptica. Inicialmente os primeiros tratamentos para o TDM envolviam a utilização de inibidores da enzima monoaminaoxidase (IMAO) e os antidepressivos tricíclicos (ADT) (Venkoba Rao, 1994; Negrão e Gold, 2007; Otte et al., 2016). Os IMAOs previnem a degradação dos neurotransmissores absorvidos enquanto os ADTs inibem a recaptção das monoaminas presentes na fenda sináptica. (Berton e Nestler, 2006; Massart, et al, 2012; Carrillo et al., 2020). Apesar de efetivos em alguns casos, o tratamento com estes medicamentos apresenta baixas taxas de sucesso (30%), demora para o aparecimento dos efeitos terapêuticos – aproximadamente 1 mês - além de efeitos colaterais importantes como graves crises hipertensivas, arritmia cardíaca e perda da libido, o que culmina em baixa adesão ao tratamento pelos pacientes (Berton e Nestler, 2006; Carrillo et al., 2020; Edinoff et al., 2021).

No final da década de 80 surgiu uma nova classe de antidepressivos, os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS), representados por uma gama variada de medicamentos, dentre os quais pode se destacar o escitalopram. Eles atuam principalmente inibindo transportadores de 5-HT em neurônios pré-sinápticos permitindo que este neurotransmissor possa ficar disponível por mais tempo na fenda sináptica (Edinoff et al., 2021). Apesar dos ISRS exibirem uma performance semelhante aos ADTs e IMAOs tanto nas taxas de remissão do TDM quanto no tempo para que o fármaco exerça seus efeitos terapêuticos, os ISRS possuem efeitos colaterais mais brandos e toleráveis, o que aumenta a adesão ao tratamento pelos pacientes, e portanto tornaram-se a estratégia terapêutica de primeira escolha para o tratamento do TDM (Jobst et al., 2016; Qaseem et al., 2016; Edinoff et al., 2021).

Recentemente tem sido demonstrado que o anestésico cetamina, um conhecido antagonista não competitivo do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), possui efeito antidepressivo demonstrando que a neurotransmissão glutamatérgica também está envolvida com a fisiopatologia do TDM e pode ser um interessante alvo terapêutico para o tratamento deste transtorno (Gulyaeva, 2017; Wei et al., 2020). Usada em doses sub-anestésicas, a cetamina tem a vantagem de agir rapidamente. Em aproximadamente 40min após sua aplicação já são observados efeitos antidepressivos, inclusive em pacientes refratários a outras alternativas de tratamento. Além disso, os efeitos da administração da cetamina podem durar até 15 dias (Wei et al., 2020). Apesar dos seus benefícios, a cetamina precisa ter seu uso controlado, uma vez que em altas doses pode desencadear sintomas psicotomiméticos/dissociativos, neurotoxicidade e também pode provocar dependência (Chaki, 2017).

Para além da hipótese monoaminérgica, e mais recentemente a neurotransmissão glutamatérgica, envolvidas no estabelecimento da depressão, alguns estudos têm evidenciado que existem componentes genéticos, epigenéticos e neuroendócrinos envolvidos com este transtorno, existindo um risco aumentado em até 35% na ocorrência de TDM em parentes de primeiro grau, incidência esta, que aumenta em até 50% em gêmeos idênticos (Lohoff, 2010; Geschwind e Flint, 2015; Otte et al., 2016). Eventos estressores ao longo da vida como experiências traumáticas na infância, perda de entes queridos, problemas financeiros ou de relacionamento e/ou estressores ambientais podem alterar a expressão de genes envolvidos com o estabelecimento do TDM (Fakhoury, 2015; Otte et al., 2016). O estresse também pode desencadear uma ativação excessiva do eixo HPA, onde o aumento exacerbado da secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) provoca uma elevação anormal dos níveis de cortisol o que em última instância intensifica os sintomas depressivos, principalmente por provocar alterações nos receptores de 5-HT (Otte et al., 2016).

Tem sido demonstrado que ocorrem alterações em praticamente quase todas as regiões do encéfalo em indivíduos com TDM, dentre as quais pode-se destacar: perda de neurônios no hipocampo, redução no volume da amígdala, gânglio basal, tálamo e córtex frontal (CF) e outras regiões cerebrais, além de redução no fluxo sanguíneo e atividade no CF em indivíduos com TDM (Fakhoury, 2015; Otte et al., 2016).

O estresse e eventos traumáticos no início da vida podem induzir uma resposta inflamatória exacerbada que pode estar relacionada com o surgimento da depressão na vida adulta (Danese e Lewis, 2017). Em modelos animais, ratos expostos a privação materna (PM) no período pós-natal exibiram comportamento do tipo depressivo na idade adulta o que foi

correlacionado com aumento nos níveis de citocinas pro-inflamatórias e ativação microglial (Réus et al., 2017, 2019). Esta associação direta tem sido demonstrada em diversos trabalhos científicos onde o TDM e processos inflamatórios parecem estar intimamente relacionados (Kim e Won, 2017; Franklin et al., 2018). Foi evidenciado que padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou a danos (DAMPs) estão envolvidos com o desenvolvimento da neuroinflamação e sintomas depressivos induzindo a liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias pelo tecido cerebral e células microgлияis através da ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB) e do inflamassoma *NLR family pyrin domain-containing 3* (NLRP3) (Fleshner et al., 2017). Em uma revisão de literatura, Franklin et al. (2018), apontaram mais de 20 estudos que relacionaram diversos DAMPs tais como: histonas, ácidos nucléicos, citocinas, proteínas de choque térmico (HSP), dentre outros e sua relação estreita entre a neuroinflamação e o TDM. Kim e Won (2017), relacionaram a neuroinflamação com o desenvolvimento de alteração nas funções e estruturas cerebrais ligadas ao TDM, onde o aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias no cérebro leva a um acúmulo de metabólitos neurotóxicos da via da quinurenina, ocasionando alterações na função e estrutura de áreas cerebrais envolvidas com o processamento das emoções, e possivelmente induzindo os sintomas depressivos. Já Woelfer et al. (2019) descreveram como a neuroinflamação pode afetar a neurotransmissão monoaminérgica e glutamatérgica ocasionando o estabelecimento da depressão, situação na qual a ativação de células microgлияis, principalmente através de liberação de Interleucina-6 (IL-6), Fator de Necrose Tumoral *Alfa* (TNF- α) e Interleucina 1 - *beta* (IL-1 β), interferem na síntese de dopamina e 5-HT, provocando um desbalanço do sistema glutamatérgico (Dey e Giblin, 2018), afetando a neurogênese, e induzindo uma diminuição na proliferação celular (Jeon e Kim, 2018), mediando em parte os efeitos da neuroinflamação nas alterações comportamentais relacionadas à depressão (Fleshner et al., 2017).

Nos últimos anos têm crescido no ambiente científico a divulgação de estudos que investigam a relação entre os microrganismos presentes no intestino e seus efeitos nas funções cerebrais (Alam et al., 2017; Plaza-Diaz et al., 2019; Bastiaanssen et al., 2020). Tem sido demonstrado que a microbiota intestinal e seus metabólitos podem estar associados a diversos transtornos neuropsiquiátricos como esquizofrenia, transtorno do espectro autista, transtornos de ansiedade e TDM, bem como com a doença de Parkinson (Evrensel e Ceylan, 2015; Smith e Parr-Brownlie, 2019). Assim, a microbiota intestinal vem sendo abordada como alvo terapêutico para pacientes com transtornos mentais (Desbonnet et al., 2014; Hsiao et al., 2014; Dinan e Cryan, 2017). Porém, mais estudos são necessários para elucidar o papel da microbiota intestinal e seus possíveis efeitos terapêuticos na saúde mental.

1.2 RELAÇÃO ENTRE PRIVAÇÃO MATERNA E O TDM

Desde o momento da concepção, passando pelo período pré-natal e a primeira infância, as crianças são especialmente vulneráveis a eventos estressores (Danese e Lewis, 2017; Lautarescu et al., 2020; Van den Bergh et al., 2020). Durante o início da vida tanto o sistema imune quanto o cérebro não estão totalmente formados. Neste período de rápido desenvolvimento, o sistema nervoso central (SNC) da criança se adapta aos estímulos ambientais recebidos durante o seu crescimento, exibindo respostas únicas e individuais correspondentes a realidade à qual está inserida (Danese e Lewis, 2017). Experiências mentalmente desafiadoras para as crianças como: conflitos familiares e violência doméstica, abusos na infância, além da ausência de cuidado parental provocada pela morte, separação ou abandono de um ou ambos os pais podem influenciar de modo negativo o comportamento, o desenvolvimento emocional e cognitivo, além de contribuir para o estabelecimento de transtornos mentais, especialmente na adolescência e vida adulta (Agid et al., 1999; Tyrka et al., 2009; Taylor, 2010; Berg et al., 2016). Foi evidenciado que indivíduos expostos a fatores estressantes no início da vida apresentam maiores probabilidades de se divorciarem e viverem sozinhos, possuem menor renda e também têm maiores chances de consumirem cigarro e desenvolverem TDM e transtorno bipolar ao longo da vida (Agid et al., 1999).

A interação com a mãe no início da vida é fundamental para o neurodesenvolvimento exercendo um papel importante no estabelecimento de sistemas neurais específicos com potencial de influenciar o comportamento adulto (Champagne et al., 2003). Em roedores, variações no comportamento materno, particularmente o ato de lambar o filhote, regula o desenvolvimento de respostas endócrinas, emocionais e cognitivas ao estresse. Nestes animais a separação materna simula uma situação de negligência e/ou perda dos pais no início da vida em humanos (Abelaira et al., 2013).

Para entender o papel de eventos adversos no início da vida e suas consequências sobre o comportamento e neurobiologia, foi desenvolvido um protocolo de PM como um modelo para estudar uma série de transtornos dentre os quais pode-se destacar o TDM (Ader et al., 1960; Anisman et al., 1998; Stuart, et al., 2019). De acordo com Abeleira et al. (2013). A PM é um modelo animal bem estabelecido e validado em roedores. Neste modelo os animais apresentam alterações comportamentais e fisiopatológicas características com TDM, que são reversíveis por tratamentos utilizados na prática clínica. Com trabalhos demonstrando que roedores expostos a PM apresentam maiores tempos de imobilidade nos testes de nado forçado ou suspensão de cauda (Waters e Gould, 2022). Além disso, também tem sido demonstrado que

estes animais apresentam déficits cognitivos, impactos na memória, além de alterações nos níveis de corticosteroides, redução nos níveis de neurotrofinas, dentre outras alterações (Chen e Baram, 2016; Tractenberg et al., 2016). Apesar destas evidências, muitos estudos com PM possuem resultados conflitantes. Isso se dá em grande parte porque há uma gama variada de protocolos de PM, especialmente no que concerne a idade e sexo dos animais, aos tempos nos quais os animais são privados, ao grau de manipulação e quando são utilizados animais de variedades diferentes (Waters e Gould, 2022).

Contudo, é consenso na comunidade científica que a PM tem uma grande relação com o TDM. Oomen et al. (2009) demonstraram que a PM 3 dias após o nascimento por um período de 24h, reduz a neurogênese no hipocampo de ratas. Em outro estudo, quando o protocolo de PM foi realizado no 11º dia após o nascimento, foi encontrada uma redução nos níveis de taurina no hipocampo de ratos machos, mas não em fêmeas (Barbosa Neto et al., 2012). Situação que se inverteu quando os níveis do ácido gama-aminobutírico (GABA) foram avaliados, com redução no hipocampo de fêmeas, o que não ocorreu nos machos (Barbosa Neto et al., 2012). Foi demonstrado que a PM pode induzir comportamentos do tipo depressivo em ratos adultos, o que foi correlacionado com aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-1 β , IL-6 e o TNF- α , redução dos níveis de Interleucina-10 (IL-10), bem com um aumento de indicadores relacionados ao estresse oxidativo no CF e hipocampo destes animais Réus et al., 2017).

Também tem sido evidenciada uma estreita relação entre as neurotrofinas e o estabelecimento do TDM (Fomby e Cherlin, 2011). Estas proteínas possuem um papel importante na plasticidade sináptica nos processos de neurogênese e sobrevivência neuronal (Lindsay et al., 1994; Huang Reichardt, 2001). Com estudos em modelos animais demonstrando que fatores estressores interferem negativamente na expressão das neurotrofinas bem como em suas vias metabólicas (Cattaneo et al., 2010; Chen et al., 2020; Arosio et al., 2021). Em ratos expostos a PM ocorre uma redução nos níveis do fator neurotrófico-derivado do cérebro (BDNF) na vida adulta o que é revertido quando estes animais são tratados com antidepressivos (Réus et al., 2011, 2013). Efeito semelhante foi observado no estudo de Pinheiro et al. (2015) onde a PM além de reduzir os níveis de BDNF o que foi associada com redução na memória de curto prazo.

Eventos estressantes nos primeiros anos de vida interferem na microbiota intestinal e provocam um estado de disbiose, que é representado por um desequilíbrio entre bactérias patogênicas e microrganismos não patogênicos (Forsythe et al., 2010).

Esse desbalanço na população de microrganismos intestinais, está envolvido com um aumento da inflamação intestinal e alterações epigenéticas que estão relacionadas com fatores como predisposição à resistência à insulina e ao diabetes (Morshedi et al., 2020), doenças neurodegenerativas (Nandwana et al., 2022) e o aparecimento de transtornos mentais como o TDM (Sudo, 2006; O'Mahony et al., 2009; Evrensel e Ceylan, 2015; Gur et al., 2017; Murakami et al., 2017). Nesse contexto se fazem importantes as investigações de fatores que possam atenuar os efeitos negativos da PM e seus impactos na microbiota intestinal e por extensão no estabelecimento do TDM na vida adulta.

1.3 EIXO MICROBIOTA INTESTINO E CÉREBRO

O intestino humano abriga mais de 1.000 espécies diferentes de bactérias. Estes microrganismos evoluíram conjuntamente com a espécie humana, estabelecendo uma relação de mutualismo. O ambiente entérico serve como abrigo e proteção além oferecer um aporte constante de nutrientes para os microrganismos que o habitam, ao passo que estes residentes contribuem para digestão dos alimentos, produzem vitaminas e têm participação importante na resposta imune e processo inflamatórios (Rajilić-Stojanović e de Vos, 2014; Lloyd-Price et al., 2016; Nguyen et al., 2016). O cérebro e o intestino interagem entre si através de um refinado controle entre o sistema nervoso autônomo (SNA) que regula o sistema digestivo, principalmente no esôfago, estômago e ânus e o sistema nervoso entérico (SNE) que controla principalmente o fluxo intestinal (Rhee et al., 2009; Furness, 2012). A microbiota intestinal interage com estes dois sistemas pela modulação de respostas neuroendócrinas e do sistema imune (Foster e McVey Neufeld, 2013; Dinan e Cryan, 2017).

Em condições normais o SNC por meio do SNA controla a liberação de muco intestinal que serve como biofilme para a microbiota local. Está, por sua vez, libera peptídeos e ácidos graxos que em interação com o SNE podem aumentar ou reduzir a velocidade do fluxo intestinal (Rhee et al., 2009). Essa relação entre os SNC e a microbiota tem sido demonstrada em estudos que evidenciam que a composição da flora intestinal está relacionada com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a Alzheimer, Parkinson e esclerose múltipla (Nandwana et al., 2022) bem como no desenvolvimento do TDM (Bastiaanssen et al., 2020). Estudos com modelos animais e em humanos têm demonstrado que fatores externos como estresse, presença de doenças, uso de antibióticos, dieta e estilo de vida, podem provocar um estado de disbiose intestinal (Forsythe et al., 2010), o que altera a permeabilidade intestinal (Bastiaanssen et al., 2020), e permite que antígenos provenientes de bactérias patogênicas

tenham acesso a corrente sanguínea, ativando a resposta imune, o que induz um aumento na liberação de citocinas pro-inflamatórias, hiperativação do eixo HPA e consequente aumento nos níveis de cortisol (Sugaya et al., 2015; Bastiaanssen et al., 2020). Níveis altos de glicocorticóides desregulam receptores serotoninérgicos no encéfalo, como visto em indivíduos com TDM (Otte et al., 2016). Além disso, as citocinas pró-inflamatórias liberadas na corrente sanguínea podem atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e induzir um processo de neuroinflamação, intensificando os sintomas do TDM (Bastiaanssen et al., 2020; Carlessi et al., 2021).

Fatores como tipo de parto e a alimentação recebida pela criança influenciam a população de bactérias presentes na microbiota intestinal do indivíduo e podem estar associadas com resistência à insulina, obesidade e com o TDM (Cani et al., 2007; Rabot et al., 2010; Carlessi et al., 2021). Além disso, eventos estressantes no início da vida podem impactar negativamente a microbiota, e por extensão as respostas imunológicas em crianças, induzindo o aparecimento de uma série de doenças na infância como, síndrome do intestino irritável, doença celíaca, constipação e dor abdominal (Saeed et al., 2022). Tem sido demonstrado que roedores expostos a PM apresentam disbiose intestinal (Pusceddu et al., 2015) e estas alterações na microbiota intestinal são consequência direta da exposição ao estresse, uma vez que nesse modelo animal as mudanças na flora intestinal ocorrem independentemente da população de bactérias que os filhotes herdaram de suas mães (Kemp et al., 2021). Por outro lado, a presença de uma microbiota saudável ou o restauro da flora intestinal com microrganismos não patogênicos pode exercer efeitos benéficos.

Tamana et al. (2021) demonstraram que meninos com um ano de idade que tinham microbiota com predominância de bactérias dos filos Bacteroidetes ou Firmicutes apresentaram melhores funções cognitivas e melhor desenvolvimento da linguagem aos dois anos de idade quando comparados com meninos que tinham uma microbiota com predominância de bactérias do filo Proteobacteria, evidenciando os benefícios da microbiota no neurodesenvolvimento e cognição.

Em ratos, mudanças na dieta foram capazes de reverter a disbiose provocada pela PM, restaurando a qualidade da população bacteriana nestes animais (Pusceddu et al., 2015). Em outro estudo, animais expostos a PM, apresentaram alterações comportamentais e bioquímicas relacionadas ao TDM e estes efeitos foram atenuados nos grupos que receberam o probiótico *Bifidobacterium infantis* (Desbonnet et al., 2010). Resultado semelhante também foi encontrado no estudo de Yang et al. (2022), no qual a suplementação de ratos que sofreram PM com *Lactobacillus casei*, reverteu o comportamento depressivo bem como normalizou os níveis

de monoaminas e BDNF no cérebro destes animais, revelando um possível envolvimento da microbiota intestinal na regulação do SNC. Juntos estes dados expõe a importância de estudos que avaliem o potencial de terapias que tenham como alvo a flora intestinal e sua possível associação com transtornos psiquiátricos.

1.4 ESCITALOPRAM, CETAMINA, PROBIÓTICO E TDM

Pelo fato de o TDM ser de causa multifatorial, diversas estratégias terapêuticas têm sido utilizadas para enfrentar este transtorno e seus sintomas, com destaque para o uso de antidepressivos ISRS como o escitalopram e, mais recentemente, o a utilização de medicamentos que agem no sistema glutamatérgico, como a cetamina. Apesar da eficiência comprovada de tais abordagens, estas ainda apresentam efeitos colaterais significativos. Desse modo, o uso de probióticos e seu possível papel no restauro de uma microbiota saudável e seus efeitos em alguns transtornos psiquiátricos vêm sendo estudado (Chaki, 2017; Macedo et al., 2017; Edinoff et al., 2021).

O escitalopram tem seu uso bastante difundido e é utilizado como opção de primeira escolha para o tratamento de transtornos psiquiátricos como ansiedade e depressão. Caracterizado por ser o enantiômero S do citalopram racêmico (R-citalopram), possui relativa eficácia no tratamento do TDM, apresentando boa tolerância e aderência ao tratamento pelos pacientes (Zhong, Haddjeri and Sánchez, 2012; Cipriani et al., 2018; Edinoff et al., 2021). Possui alta afinidade com transportadores de 5-HT, enquanto não apresenta ou tem baixa afinidade com transportadores de dopamina e canais iônicos (Vaugh e Goa, 2003; Edinoff et al., 2021). Este fármaco começa a exercer seu efeito terapêutico no alívio dos sintomas do TDM após uma ou duas semanas do início do tratamento (Vaugh e Goa, 2003). Foi demonstrado que pacientes com TDM quando tratados com escitalopram exibem níveis de controlabilidade cerebral, representada por uma melhor capacidade de intercomunicação e gerenciamento de redes neuronais entre diferentes regiões do cérebro semelhante a de indivíduos saudáveis (Fang et al., 2022). Essas características podem estar relacionadas com um possível efeito neuroprotetor do escitalopram como demonstrado em estudos que evidenciaram uma elevação nos níveis de BDNF no soro de indivíduos após o tratamento crônico com este antidepressivo (Cattaneo et al., 2010). Fato que também foi demonstrado em modelo animal de estresse crônico, no qual ratos com comportamento depressivo exibiram uma normalização dos níveis cerebrais de BDNF após tratamento com escitalopram (Seo et al., 2019).

Apesar de o escitalopram ser amplamente utilizado no tratamento do TDM, um estudo recente demonstrou que 27% dos pacientes não respondem ao tratamento, enquanto um contingente de até 58% dos indivíduos tratados demoram pelo menos quatro semanas para sentirem algum efeito benéfico no alívio dos sintomas do TDM (Larsen et al., 2020). Tais evidências vão ao encontro com outros estudos que demonstraram que 30% dos pacientes não respondem ao tratamento enquanto somente um terço dos pacientes tem remissão completa dos sintomas (Rush et al., 2006; Ng et al., 2013; Rosenblat et al., 2018). Além disso, o uso deste medicamento pode provocar diminuição da libido, distúrbios ejaculatórios, náusea, diarreia, insônia, boca seca, dores de cabeça, tontura, tremores além de ansiedade e inquietação (Waugh and Goa, 2003; Ramic et al., 2020; Edinoff et al., 2021). Esses efeitos adversos levam ao abandono do tratamento por muitos pacientes e busca por tratamentos alternativos (Rosenblat et al., 2018).

Derivada do anestésico fenilciclidina, a cetamina vem se tornando uma opção popular para o tratamento do TDM, especialmente para pacientes refratários ao escitalopram ou outros ISRS, especialmente por exibir efeitos antidepressivos rapidamente, a partir de 45 minutos, e por estes efeitos serem prolongados, se estendendo em alguns casos, por até 15 dias após uma única aplicação deste fármaco (Berman et al., 2000; Wei et al., 2020). O fato de a cetamina ser classificada como um antagonista não competitivo do receptor NMDA (Gulyaeva, 2017), torna o uso deste fármaco interessante no tratamento do TDM uma vez que foi demonstrado que a neurotransmissão glutamatérgica está associada ao TDM (Huang et al., 2017; Li et al., 2019). De acordo com Bressan e Pilowsky (2003), parte de seus efeitos terapêuticos também pode ser exercida pela indução da liberação de glutamato e estimulação dos receptores alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e metabotrópicos de glutamato (mGluR). Foi demonstrado que a cetamina aumenta a fosforilação da proteína de ligação responsiva a adenosina 3,5-monofosfato cíclico (CREB) e do receptor tropomiosina quinase B (TrkB) no hipocampo (Réus et al., 2016b). Em um estudo utilizando cérebros post mortem de pacientes com TDM foi evidenciado uma elevação na expressão de genes mGluR e ionotrópicos de glutamato (iGluR) no CF dos indivíduos analisados (Gray et al., 2015).

O glutamato liberado se liga e ativa os receptores AMPARs pós-sinápticos, resultando em maior liberação do BDNF, ativação do TrkB e subsequente promoção da síntese de proteínas (Ignácio et al., 2016). Essas evidências sugerem que o tratamento com cetamina pode exercer efeito neuroprotetor em indivíduos com TDM, como observado em estudos que demonstraram que este fármaco age rapidamente na restauração da arborização dendrítica e na densidade das espinhas sinápticas (Bessa et al., 2009; Morais et al., 2017), bem como na

redução da apoptose de neurônios hipocâmpais de camundongos após administração de TNF- α (Wang et al., 2021). Este fármaco também possui um papel adjuvante na redução da neuroinflamação, como demonstrado no trabalho de Tan et al. (2017) onde a administração de cetamina diminuiu os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em camundongos. Apesar dos seus benefícios no tratamento do TDM a indicação e uso da cetamina precisam ser bem estudados, uma vez que em excesso ela pode causar dependência e neurotoxicidade, expondo a necessidade da busca de outras alternativas terapêutica para o TDM (Chaki, 2017).

Nos últimos anos a relação entre a microbiota intestinal e suas implicações com o funcionamento do SNC e o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos tem sido extensivamente estudada (Desbonnet et al., 2014; Hsiao et al., 2014; Cryan e Dinan, 2015). Evidências têm demonstrado que alterações no microbioma podem contribuir para o estabelecimento e/ou agravamento do TDM (Bastiaanssen et al., 2020). Os probióticos são uma classe diversa de microrganismos que podem trazer benefícios a saúde do hospedeiro quando ingeridos em quantidades adequadas (Hill et al., 2014). Os probióticos agem em várias frentes na melhora da saúde dos seus hospedeiros. Bactérias probióticas do filo Bacteroidetes bem como dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* induzem a produção de HSPs pelo epitélio intestinal, especialmente as proteínas HSP25 e HSP72, que possuem efeito citoprotetor auxiliando na manutenção da integridade da parede intestinal. Além disso, os probióticos induzem a expressão de genes envolvidos na manutenção entre as junções das células epiteliais intestinais e auxiliam na produção do muco intestinal que serve como uma barreira contra microrganismos patogênicos (Thomas e Versalovic, 2010; Bermudez-Brito et al., 2012). Algumas bactérias probióticas excluem suas contrapartes patogênicas competindo pelos mesmos sítios de ligação no intestino ou em muitos casos auxiliam no combate dos invasores pela secreção de bacteriocinas, peptídeos com propriedades antimicrobianas, que previnem a proliferação de patógenos (Plaza-Diaz et al., 2019).

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) como acetato, butirato, lactato e propionato, são outra classe de metabólitos produzidos pelas bactérias a partir da fermentação de polissacarídeos durante a digestão, e que de modo geral são associados com a microbiota de indivíduos saudáveis em diferentes estágios da vida (Bermudez-Brito et al., 2012; Plaza-Diaz et al., 2019). Alguns dos AGCCs têm ação neuroprotetora no SNC. Conforme demonstrado no trabalho de Chen et al. (2019), o transplante de microbiota fecal rica em AGCCs atenuou os danos provocados pelo choque isquêmico em ratos e estes efeitos foram correlacionados com um aumento na população de *Lactobacillus* e elevação dos níveis de butirato. Em outro estudo o tratamento oral com *Lactobacillus reuteri* atenuou o comportamento do tipo depressivo em

camundongos expostos a um modelo de estresse crônico, normalizou a população de bactérias benéficas, bem como recuperou os níveis de triptofano no CF destes animais, indicando que os probióticos podem ter efeitos positivos no metabolismo da 5-HT. Além disso, também foi evidenciado um aumento na produção de acetato pela microbiota dos animais com comportamento do tipo depressivo, o qual foi revertido pela administração de *L. reuteri* (Xie et al., 2020). Em um estudo utilizando um modelo animal de estresse psicossocial Van de Wouw et al. (2018) também encontraram níveis elevados de acetato em camundongos, demonstrando que alterações na microbiota podem alterar os perfis dos AGCCs produzidos o que pode trazer efeitos negativos relacionados ao TDM.

Alguns estudos têm apontado que o consumo de probióticos pode atenuar sintomas relacionados ao TDM (Messaoudi et al., 2011; Steenbergen et al., 2015). Em um trabalho publicado por Akkasheh et al. (2016) foi demonstrado que pacientes com TDM que receberam *L. casei*, *L. acidophilus* e *B. bifidum* apresentaram uma redução dos sintomas do TDM quando foi aplicada uma escala de depressão, o que foi acompanhado por uma redução nos níveis de insulina, resistência à insulina e proteína C reativa, além de um aumento nos níveis séricos de glutatona quando comparados com grupo placebo. Tanto a resistência à insulina quanto a proteína C reativa estão envolvidas com processos inflamatórios e são preditores do TDM (Watson et al., 2021; Orsolini et al., 2022). Já baixos níveis de glutatona são encontrados em pacientes depressivos, especialmente os que apresentam anedonia, representada pela diminuição no prazer em realizar as tarefas cotidianas (Freed et al., 2017). Os probióticos parecem exercer efeitos benéficos em vários parâmetros relacionados ao TDM. Em ratos expostos a um modelo de estresse crônico, a administração de *L. Helveticus* melhorou a disfunção cognitiva e apresentou efeito anti-inflamatório, o que foi correlacionado com um aumento dos níveis plasmáticos de IL-10, bem como o envolvimento deste probiótico na regulação do eixo HPA com consequente diminuição dos níveis séricos de corticoesterona e adrenocorticotropina, o que foi associado com aumento nos níveis hipocâmpais das monoaminas noradrenalina e 5-HT e possível efeito neuroprotetor caracterizado pelo aumento da expressão de RNAm da proteína BDNF (Liang et al., 2015). Dados semelhantes também foram encontrados em outro estudo em que a administração de *L. paracasei* e *L. rhamnosus* atenuaram os sintomas relacionados com depressão e ansiedade em camundongos expostos a um protocolo de estresse crônico o que foi associado a um aumento nos níveis de 5-HT e BDNF no CF e hipocampo, respectivamente (Cheng et al., 2020).

1.5 NEUROTROFINAS

As neurotrofinas representam um grupo de proteínas que estão envolvidas com o crescimento, sobrevivência e manutenção de neurônios dos SNC e periférico. Dentre as neurotrofinas, o BDNF está envolvido com processos de sobrevivência, diferenciação, desenvolvimento e plasticidade neuronal (Hing et al., 2018). Esta proteína exerce seus efeitos ligando-se ao receptor TrkB que em última instância promove a ativação do fator de transcrição CREB, desencadeando suas funções intracelulares formando a via de ativação BDNF/TrkB/CREB (Mohammadi et al., 2018). Esta via parece estar relacionada com a presença de diversas alterações cerebrais e comportamentais, conforme elucidado no trabalho de Dong et al. (2018). Neste estudo animais expostos a dexametasona intraútero apresentaram déficit cognitivo, diminuição do número de neurônios e aumento da apoptose no hipocampo, bem como uma redução na cascata de sinalização BDNF/TrkB/CREB (Dong et al., 2018). Essa afirmação encontra suporte no trabalho de Kundakovic et al. (2015), onde foi demonstrado que em animais que passaram por adversidades no início da vida ocorreu uma redução na expressão de BDNF. Esses dados sugerem que esta neurotrofina pode ser utilizada como um biomarcador para mensurar o risco do estabelecimento de psicopatologias. Além disso, no estudo de Réus et al. (2011) foi demonstrado que animais expostos à PM, sofreram alterações comportamentais bem como redução nos níveis de BDNF e do fator de crescimento nervoso (NGF) na idade adulta. Estes trabalhos reforçam que diversos estressores no início da vida, podem culminar em TDM no futuro.

A síntese de BDNF ocorre em regiões que participam da função emocional e cognitiva, como o hipocampo sendo que a redução na expressão deste fator de crescimento pode afetar a neuroplasticidade e causar atrofia neuronal nesta região, exercendo impactos negativos na memória e nas emoções de indivíduos com TDM (Phillips, 2017). Além disso, foi demonstrado em modelo animal que a 5-HT pode regular a expressão do BDNF durante episódios de estresse. Neste modelo houve um aumento na expressão de RNAm de BDNF em neurônios do hipocampo e CF de ratos tratados com agonistas de receptores serotoninérgicos ao passo que o tratamento com antagonistas destes receptores provocou uma redução na expressão de RNAm de BDNF (Jiang et al., 2016). Resultado similar foi encontrado em um estudo que encontrou uma redução na expressão de RNAm de TrkB e BDNF no soro de indivíduos passando pelo primeiro episódio depressivo, indicando que alterações nesta via podem estar implicadas no início do estabelecimento do TDM (Chen et al., 2020). Essas evidências também podem explicar os possíveis efeitos terapêuticos de ISRS, como o

escitalopram, no aumento dos níveis séricos de BDNF bem como na normalização dos níveis cerebrais desta proteína (Cattaneo et al., 2010; Seo et al., 2019). De maneira semelhante o receptor NMDA parece estar envolvido com a regulação das neurotrofinas como apontado no estudo de Gwag e Springer (1993), onde a administração de NMDA intracerebroventricular induziu um aumento robusto na expressão de RNAm do BDNF no hipocampo de ratos ou pelo estudo de Abaleira et al. (2016), que demonstrou que o uso da cetamina aumentou a fosforilação do CREB e do TrkB no hipocampo de ratos. A utilização de probióticos também parece exercer algum efeito na regulação das neurotrofinas uma vez que foi demonstrado que a expressão do BDNF e TrkB foram aumentadas após a administração de *L. casei* (Gu et al., 2020), enquanto *L. paracasei* e *L. rhamnosus* aumentaram os níveis de BDNF no hipocampo de roedores (Cheng et al., 2020).

Devidos as limitações terapêuticas dos tratamentos antidepressivos em uso corrente e os possíveis impactos da PM no estabelecimento do TDM, estudos que avaliem o potencial de terapias adjuvantes nessa área são importantes, especialmente para oferecer alternativas para pacientes resistentes aos tratamentos clássicos. Nesse contexto, é de especial interesse a compreensão dos mecanismos de ação pelos quais o uso de probióticos exercem seus impactos positivos na melhora de sintomas associados ao TDM em especial na possível relação do impacto da flora intestinal na regulação dos níveis de neurotrofinas no SNC, haja vista que essas proteínas possuem elevada importância nos processos de plasticidade sináptica e desenvolvimento neuronal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do tratamento com escitalopram, cetamina e probiótico sobre os níveis cerebrais de BDNF, TrkB e CREB em ratos adultos machos e fêmeas, expostos a estresse no início da vida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar os níveis BDNF, TrkB e CREB no CF e hipocampo de ratos machos e fêmeas submetidos a estresse por PM e tratados com cetamina;
- b) Avaliar os níveis de BDNF, TrkB e CREB no CF e hipocampo de ratos machos e fêmeas submetidos a estresse por PM e tratados com escitalopram;
- c) Avaliar os níveis de BDNF, TrkB e CREB no CF e hipocampo de ratos machos e fêmeas submetidos a estresse por PM e tratados com probiótico (*Bifidobacterium infantis*).

3 METODOLOGIA

3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações para o uso de animais da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) e o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) sob número 032/2019-1 (Anexo I).

3.2 ANIMAIS

Para esse estudo foram utilizadas ratas Wistar jovens e virgens procedentes da colônia de reprodução do Biotério da UNESC, as quais foram abrigadas por uma semana na presença de machos para experiência sexual. No final do período de sete dias, as ratas grávidas foram alojadas individualmente com acesso a alimento e água *ad libitum*. Todas as mães e filhotes foram mantidas em gaiolas colocadas sobre estantes e sob os cuidados dos funcionários do Biotério. A temperatura do ambiente foi controlada entre 20 e 22°C, ciclo claro-escuro 12/12h, alimentados com dieta padrão para roedores e água do sistema público de fornecimento (torneira) colocado em mamadeiras para roedores. Durante todos os procedimentos os animais foram mantidos em condições padrões seguindo as normas do comitê de ética da UNESC.

3.3 PROTOCOLO DE PM E TRATAMENTOS

O modelo animal de PM é utilizado para estudar as consequências de eventos estressores no início da vida. Em roedores este modelo simula situações equivalentes a perda de um ou ambos os genitores e/ou negligência parental que eventualmente ocorrem com seres humanos. Sendo considerado um dos mais potentes desencadeadores de estresse natural ao longo do desenvolvimento (Abelaira et al., 2014). O protocolo de PM é também um importante modelo para investigação da fisiopatologia e tratamento do TDM (Abelaira et al., 2013; Réus et al., 2015).

No presente estudo, ratos filhotes de ambos os sexos, foram privados da mãe durante 3 h/dia nos 10 primeiros dias após o nascimento. A privação consiste em retirar a mãe

da caixa, mantendo os filhotes na presença do odor materno. Os animais não privados (controles) permaneceram imperturbáveis na gaiola original com sua mãe. Os animais foram desmamados no 21º dia após o nascimento.

Ao final do protocolo de PM, foi administrado aos animais: solução salina, escitalopram, cetamina, ou probiótico por 50 dias, sendo que os animais foram separados nos seguintes grupos: 1) Controle + Sal (n= 8, sendo 4 machos e 4 fêmeas para cada grupo); 2) Privado + Sal (n= 8, sendo 4 machos e 4 fêmeas para cada grupo); 3) Privado + Escitalopram (n= 8, sendo 4 machos e 4 fêmeas para cada grupo); 4) Privado + Cetamina (n= 8, sendo 4 machos e 4 fêmeas para cada grupo); e 5) Privado + Probiótico (n= 8, sendo 4 machos e 4 fêmeas para cada grupo).

Todos os animais iniciaram o tratamento com 11 dias pós-natal (DPN) até atingirem a idade adulta com 61 DPN. A cetamina (Dopalen) foi administrada por via intraperitoneal na dose de 15 mg/kg duas vezes por semana durante 50 dias. Nos dias em que os animais não receberam cetamina, foi administrado solução salina (0,09%). O escitalopram (Reconter) foi administrado via oral na dose de 10 mg/kg, uma vez ao dia durante 50 dias. O probiótico *Bifidobacterium infantis* (obtido em farmácia de manipulação da marca LEMMA) foi diluído em 100 mL de água e administrado via oral na dose 1×10^{10} de unidades formadoras de colônia (UFC) durante 50 dias. Ao final dos tratamentos os animais foram submetidos a eutanásia por decapitação e subsequente remoção das estruturas cerebrais, CF e hipocampo que foram armazenadas em freezer -80°C até a realização das análises para determinação dos níveis de CREB, BDNF e TrkB através da técnica de *western blot*.

3.4 ANÁLISE DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

As amostras congeladas foram homogeneizadas em 400uL de tampão de homogeneização com inibidor de proteases. Em seguida passaram por centrifugação por 10 min a 10.000 RPM e temperatura de 4°C. Logo após 200uL do sobrenadante foram ressuspensos em 200uL de *stop solution* com 8% de SDS. A suspensão obtida foi aquecida a 98°C por 5 min. Uma alíquota de 20uL de cada amostra foi separada para dosagem de proteínas e no restante foram adicionados 97,5uL de glicerol 40% e 31,2uL de β-mercaptoetanol. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951) em 620nm. Para separação das proteínas foram aplicadas em gel de poliacrilamida 4–20% Mini-PROTEAN® TGXTM (Bio-rad) alíquotas contendo 50ug de proteína (por amostra). A eletroforese foi realizada em tampão Tris/Glicina/SDS a 200V, 3,0A e 300Ma por até 80 min. Em seguida as proteínas foram

transferidas para membranas de poli (fluoreto de vinilideno) (PVDF) Trans-Blot Turbo Mini 0.2µm PVDF Transfer Packs (Bio-rad), utilizando equipamento Trans-blot® (Bio-rad) turbo a 25V e 1,3A por 7 min. Na sequência as membranas foram fixadas com ácido acético 1% e coradas com *Ponceau* para confirmação da transferência.

O bloqueio das membranas foi realizado com leite desnatado 5% por 2h em temperatura ambiente. Logo após as membranas foram lavadas em solução tampão e incubadas com anticorpo primário específico para BDNF, CREB, TrkB ou β -actina (1:1000), mantidos sob agitação constante durante a noite a 4°C. No dia seguinte, o excesso de anticorpo primário foi removido, e as membranas incubadas com anticorpo secundário *anti-rabbit* conjugado com peroxidase (1:20000 para BDNF, CREB e TrkB) ou (1:40000 para β -actina) por 2h em temperatura ambiente sob agitação constante. O excesso de anticorpo secundário foi removido e em seguida, as membranas foram incubadas em substrato enzimático por 5 min. A revelação das membranas ocorreu com o auxílio de um aparelho fotorevelador *Chemicon Bio-Rad*. A incubação com anti- β -actina ocorreu somente após o *strip* das membranas previamente incubadas com anticorpos para BDNF, CREB ou TrkB (Laemmli, 1970).

A imagens obtidas foram analisadas com programa *Image Lab* (Bio-rad) versão 6,1 para determinação da densidade óptica das bandas onde ocorreu a ligação com o anticorpo primário e os valores obtidos com as bandas de BDNF, CREB ou TrkB foram comparados com os valores obtidos com as respectivas bandas de β -actina.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram avaliadas usando o software SPSS versão 21.0. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via e estão expressos como média \pm erro padrão da média. Foram considerados estatisticamente significativos valores com $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 NÍVEIS DE BDNF, TRKB E CREB NO CÓRTEX FRONTAL E HIPOCAMPO EM ANIMAIS EXPOSTO A PM E TRATADOS COM DIFERENTES FÁRMACOS COM AÇÃO ANTIDEPRESSIVA

A figura 1 ilustra as imagens representativas dos níveis de BDNF, TrkB e CREB no CF e hipocampo de machos e fêmeas. As figuras 2, 3 e 4 mostram os níveis de BDNF, TrkB e CREB respectivamente, no CF e hipocampo de fêmeas e machos, expostos ou não a PM e aos tratamentos com escitalopram, cetamina e probiótico.

Figura 1

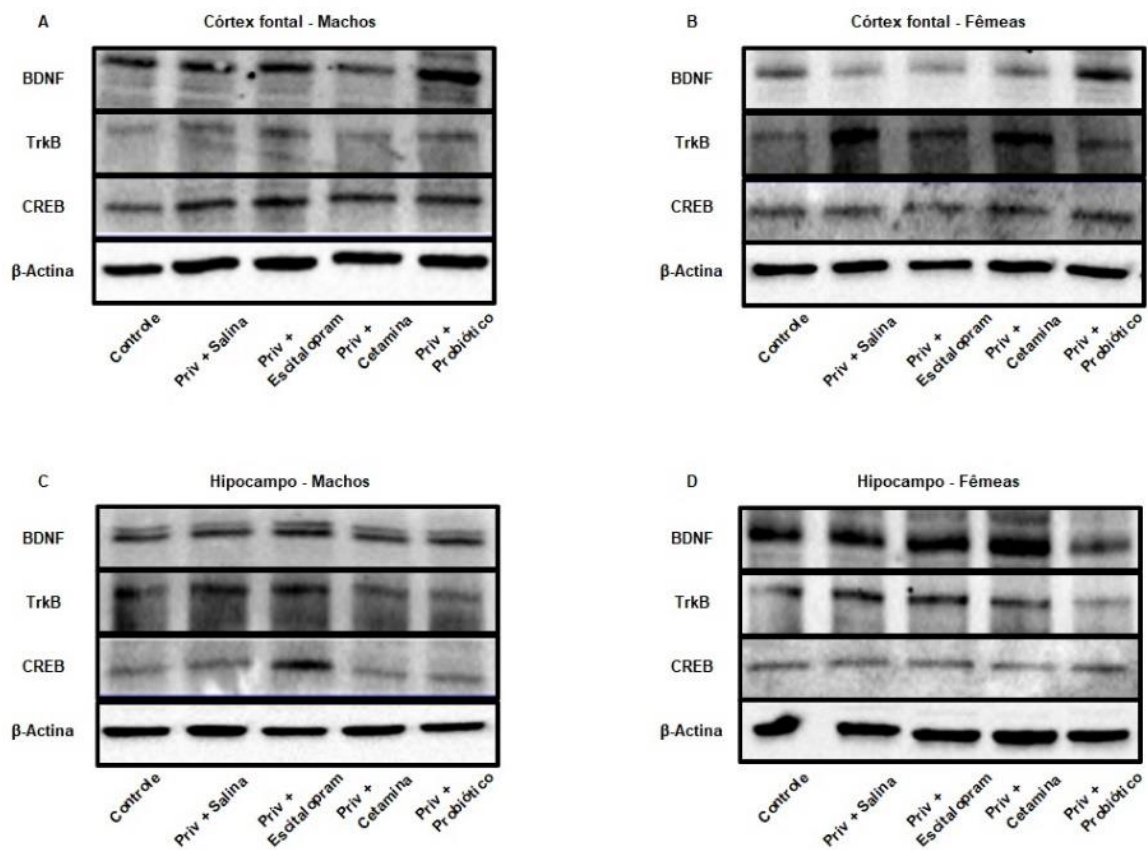


Figura 1 - Imagens representativas dos níveis de BDNF TrkB e CREB 61DPN. Níveis de BDNF, TrkB e CREB e β -Actina no CF de machos (A) e fêmeas (B) e hipocampo de machos (C) fêmeas (D) após PM e tratamento com escitalopram, cetamina e probiótico.

A figura 2 está ilustrando os efeitos do tratamento crônico com cetamina, escitalopram e probiótico nos níveis de BDNF no CF e hipocampo de ratos fêmeas (A) e machos

(B) submetidos à PM. As análises estatísticas não revelaram diferença entre os grupos estudados nos níveis de BDNF ($p > 0,05$).

Figura 2A

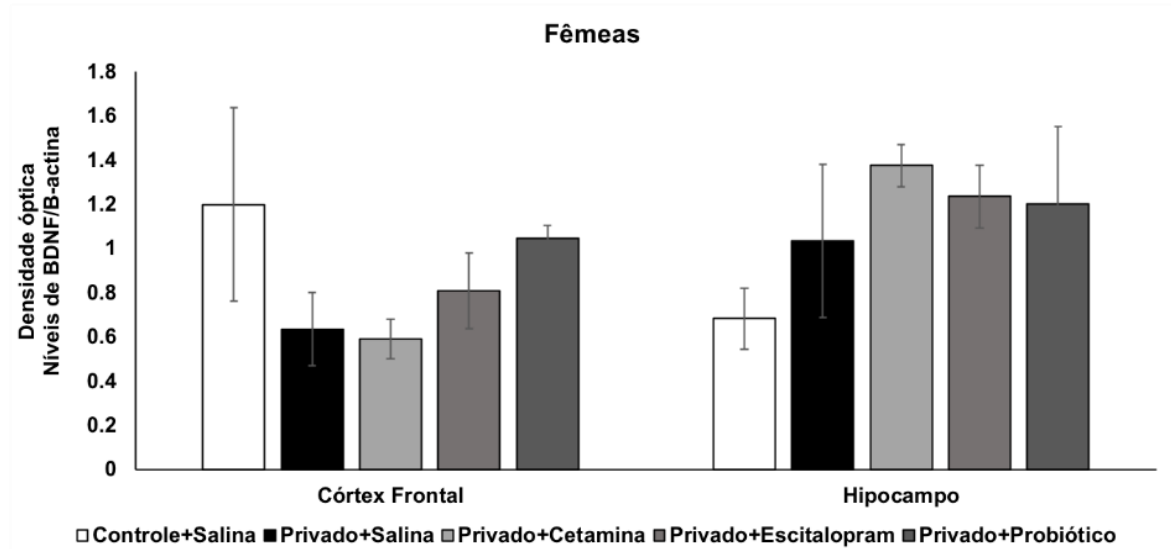


Figura 2B

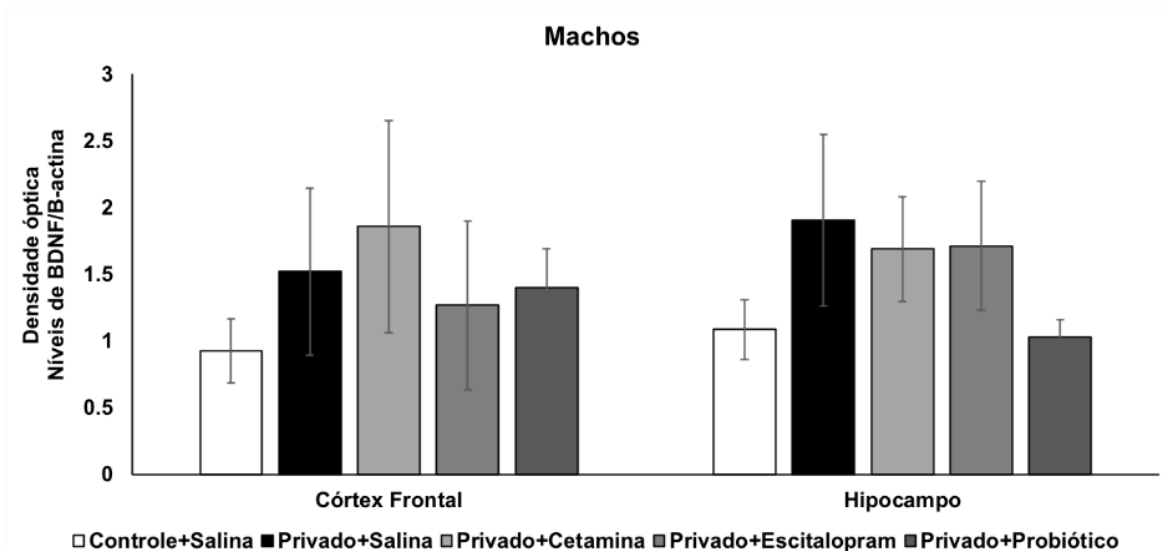


Figura 2 - Efeitos da privação materna e do tratamento com cetamina, escitalopram e probiótico nos níveis de BDNF. Níveis de BDNF no CF e no hipocampo de ratos fêmeas (A) e machos (B) de 61 dias. As barras representam a média e erro padrão da média.

Os níveis de TrkB estão apresentados na figura 3. Os resultados demonstraram que no CF de fêmeas houve um aumento nos níveis de TrkB do grupo privado tratado com probiótico, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$; Fig. 3A). Já no hipocampo de

fêmeas ou em ambas as estruturas de machos não foi encontrada diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$; Fig. 3A e B).

Figura 3A

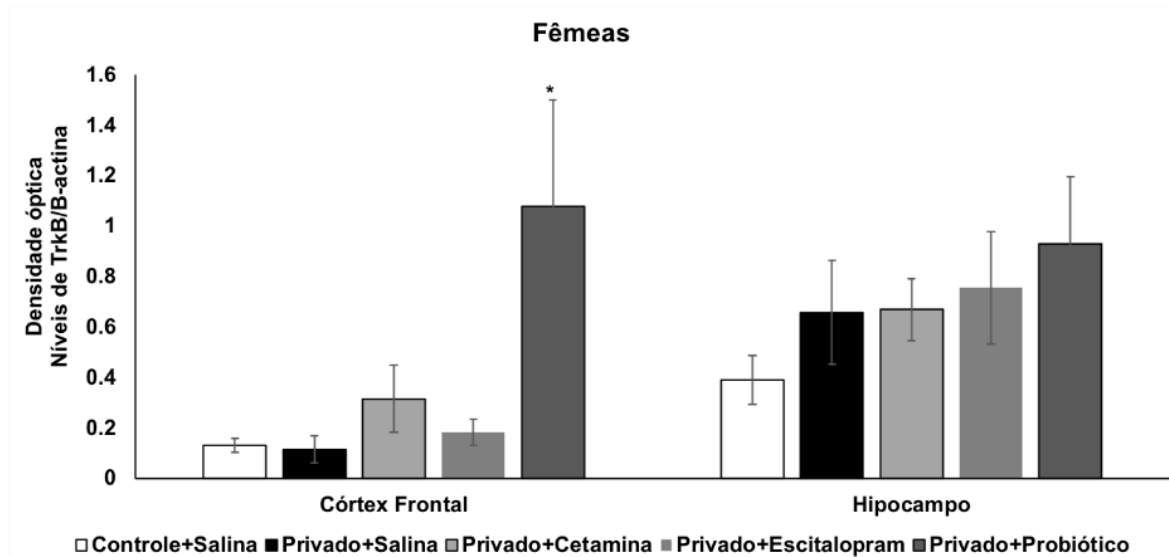


Figura 3B

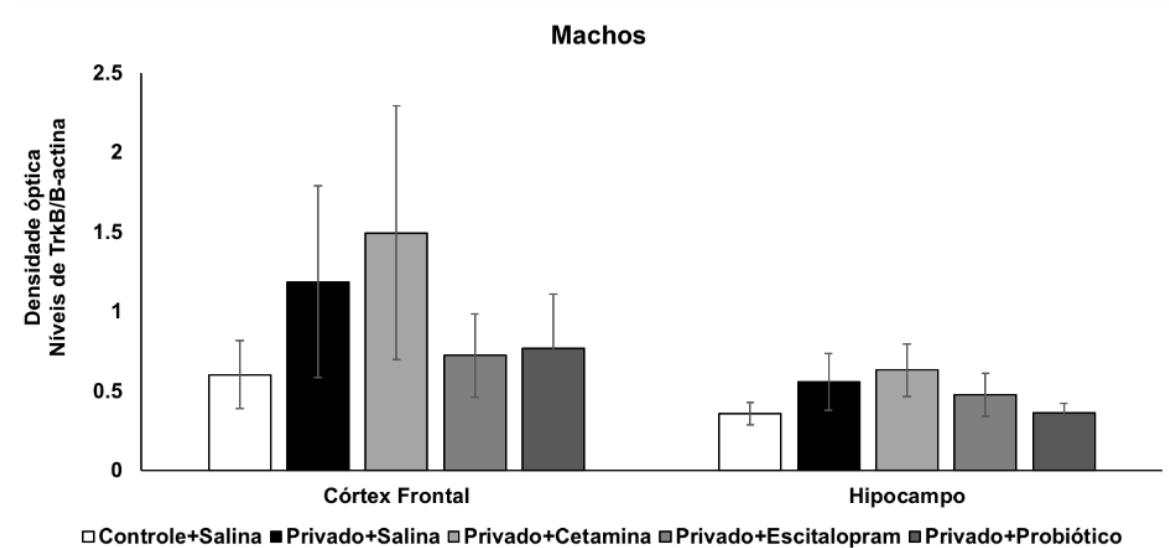


Figura 3 - Efeitos da privação materna e do tratamento com cetamina, escitalopram e probiótico nos níveis de TrkB. Níveis de TrkB no CF e no hipocampo de ratos fêmeas (A) e machos (B) de 61 dias. As barras representam a média e erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs controle+salina.

Na análise dos níveis de CREB após o tratamento com cetamina, probiótico ou escitalopram em ratos privados foi revelado que os níveis de CREB foram significativamente reduzidos no CF das fêmeas privadas dos cuidados maternos e tais níveis mantiveram-se diminuídos após o tratamento com cetamina e probiótico ($p < 0,05$; Fig. 4A). Já no hipocampo

de fêmeas ou em ambas as estruturas de machos não foi encontrada diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$; Fig. 4A e B).

Figura 4A

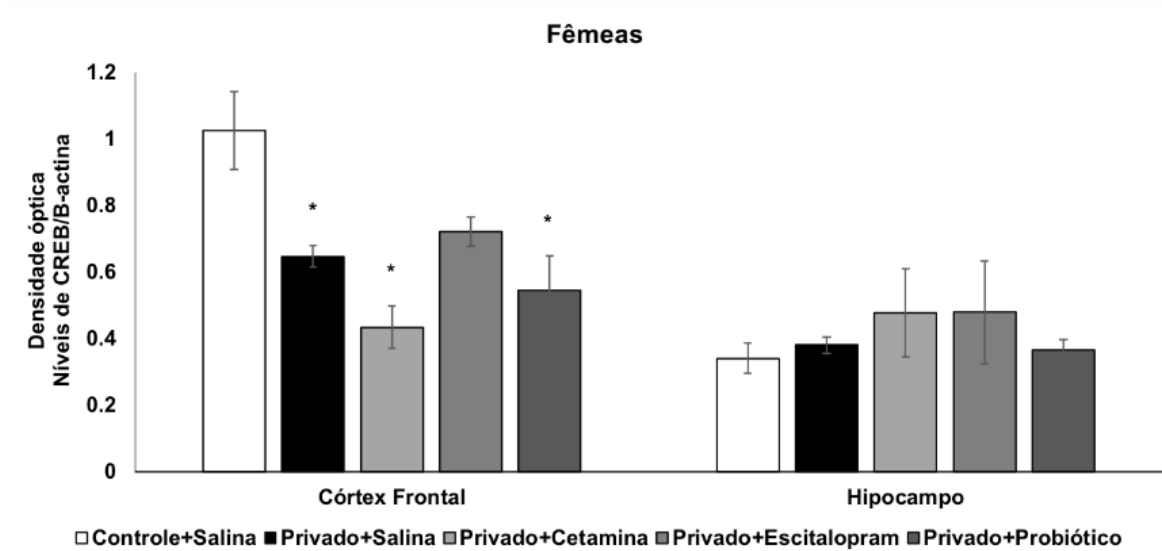


Figura 4B

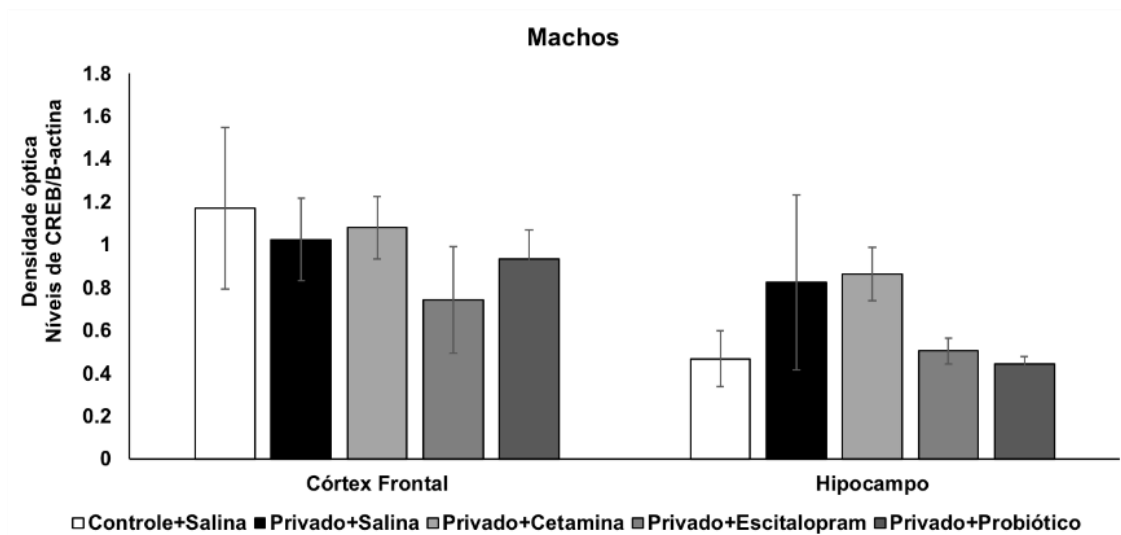


Figura 4 - Efeitos da privação materna e do tratamento com cetamina, escitalopram e probiótico nos níveis de CREB. Níveis de CREB no CF e no hipocampo de ratos fêmeas (A) e machos (B) de 61 dias. As barras representam a média e erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs controle+salina.

5 DISCUSSÃO

O TDM é um transtorno que atinge milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que as mulheres são mais propensas a serem afetadas (Otte et al., 2016; Malhi e Mann, 2018). A hipótese das monoaminas é a mais utilizada para explicar os sintomas depressivos no desenvolvimento do TDM (Negrão e Gold, 2007). Além disso, é consenso na comunidade científica que uma diversidade de outros fatores estão implicados com o estabelecimento deste transtorno, com destaque para alterações hormonais (Nandam et al., 2020), passando por impactos no aumento da inflamação sistêmica (Orsolini et al., 2022) ou cerebral (Woelfer et al., 2019) e até nos padrões de expressão de neurotrofinas (Fišar e Hroudová, 2010; Fomby e Cherlin, 2011). Diante disso diversas estratégias terapêuticas tem sido adotadas, desde o uso tradicional de ISRS como o escitalopram (Waugh e Goa, 2003) e fármacos como a cetamina que tem como alvo terapêutico o sistema glutamatérgico (Huang et al., 2017), e até como vem sendo abordado mais recentemente o uso de estratégias que exploram as interações entre a microbiota intestinal e o SNC (Bastiaanssen et al., 2020).

Diante do exposto, o foco do presente estudo foi avaliar a influência da microbiota intestinal na via BDNF/TrkB/CREB. Para tanto foi utilizado um protocolo de indução de estresse no início da vida baseado na PM. Em estudos anteriores utilizando este protocolo foi demonstrado que os animais expostos a separação materna apresentaram comportamento do tipo depressivo em 61 DPN juntamente com um aumento de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 no hipocampo e IL-6 no CF com conseqüente redução de IL-10 no soro e no hipocampo destes animais. Neste estudo a presença de parâmetros relacionados com a inflamação foi associado com um aumento do estresse oxidativo, representado pela elevação na carbonilação de proteínas e redução da enzima superóxido-dismutase (SOD) tanto no hipocampo quanto no CF, demonstrando que o protocolo de PM está associado com parâmetros relacionados ao TDM, mesmo em animais adultos (Réus et al., 2017). Recentemente o conhecimento de como este modelo animal causa sintomas relacionado ao TDM foi ampliando pelo estudo de Carlessi (2021). Neste trabalho foi apontado que o tratamento de animais expostos a PM com escitalopram, cetamina ou com o probiótico *B. infantis* foi capaz de reduzir a carbonilação de proteínas no hipocampo e soro de fêmeas privadas. Este efeito também foi exibido no CF de ambos os sexos, mas somente nos animais tratados com *B. infantis*. Demonstrando que os sintomas relacionados ao TDM, neste modelo animal, podem influenciar regiões cerebrais de maneiras diferentes e, que respostas a possíveis estratégias terapêuticas são dependentes do sexo e do tratamento empregado.

No presente estudo também foram observadas diferenças dependentes do sexo ou da estrutura analisada. O tratamento com o probiótico *B. infantis*, não exibiu diferenças significativas nos níveis de TrkB no hipocampo de ratos machos e fêmeas. Já no CF, ocorreu um aumento significativo nos níveis de TrkB nas fêmeas tratadas com *B. infantis*, enquanto nos machos não houve diferenças significativas (Figura 3).

Jiang et al. (2017) não encontraram diferenças significativas, nos níveis de TrkB no soro de pacientes com TDM tratados com escitalopram. Por outro lado, em um trabalho utilizando um modelo animal de depressão induzido por dieta deficiente em zinco, o tratamento crônico com escitalopram foi capaz de aumentar os níveis de TrkB no CF de camundongos (Młyniec e Nowak, 2015). Já em outro estudo foi encontrado um aumento nos níveis de RNAm de TrkB no hipocampo de ratos após tratamento agudo com escitalopram, porém este efeito não persistiu no grupo de animais expostos ao tratamento crônico (Kozisek et al., 2008). Demonstrando que o escitalopram pode exercer efeitos variados nos níveis de TrkB tanto em CF quanto no hipocampo e estas alterações são dependentes do tipo de estressor bom como do tempo de tratamento.

Neste trabalho a administração de cetamina também não foi capaz de alterar significativamente os níveis de TrkB em nenhum dos grupos analisados (Figura 3). De acordo com a literatura, este fármaco também exhibe respostas variadas em diferentes regiões do SNC. No estudo de Réus et al. (2016b) foi encontrado um aumento dos níveis de TrkB no CF, mas não no hipocampo de ratos machos tratados com cetamina. Já em outro estudo, a administração em dose única de cetamina foi capaz de atenuar os sintomas associados a depressão em camundongos machos, porém este efeito não foi reproduzido nos animais que receberam mais de uma dose de cetamina. Interessantemente, neste mesmo estudo a cetamina induziu uma redução nos níveis de TrkB tanto no CF quanto no hipocampo dos animais analisados (Contó et al., 2022).

Os probióticos parecem exercer efeitos positivos na elevação dos níveis de TrkB (Xu et al., 2022). No presente estudo a utilização do probiótico *B. infantis* foi capaz de induzir um aumento significativo nos níveis de TrkB no CF de fêmeas, mas não no hipocampo e os machos não exibiram diferenças nos níveis deste receptor em nenhuma das estruturas analisadas (Figura 3). Em um estudo utilizando um modelo animal de estresse crônico foi demonstrado que o tratamento com *L. casei* aumentou os níveis de TrkB no CF de ratos machos, o que foi associado com uma elevação nos níveis de BDNF e 5-HT (Gu et al., 2020). Estes resultados corroboram os dados de outro estudo onde a administração de *L. plantarum* melhorou a função cognitiva de camundongos machos expostos a um modelo de estresse crônico, o que foi

associado com elevação nos níveis de BDNF e TrkB no hipocampo (Sun et al., 2021). O papel da microbiota intestinal nos níveis de BDNF e TrkB também foi demonstrado em outro estudo onde um estado de disbiose intestinal induzida pela administração de antibióticos foi capaz de reduzir os níveis destas proteínas tanto no hipocampo quanto no CF dos animais estudados (Bistoletti et al., 2019).

No presente estudo o uso do probiótico *B. infantis* exibiu respostas diferentes no CF de machos e fêmeas. Diferenças sexuais na via BDNF, TrkB e CREB têm sido demonstradas em outros estudos. Em trabalho publicado recentemente, Dandekar et al. (2022) demonstraram que em roedores expostos a um modelo de estresse crônico, ocorreu uma redução nos níveis de BDNF no hipocampo de ratos machos, o que não ocorreu no CF. Nas fêmeas não foram encontradas mudanças em nenhuma das estruturas. Além disso, as alterações encontradas nos machos foram revertidas com o uso de uma mistura de probióticos. Em estudo anterior, utilizando roedores heterozigotos para as expressões do BDNF, foi demonstrado que os machos exibem maiores níveis de TrkB no estriado e CF enquanto no hipocampo não foram encontradas diferenças entre os sexos (Hill e Van Den Buuse, 2011).

Os impactos da microbiota intestinal no SNC são dependentes do tipo de probiótico utilizados. Em um estudo, diferentes cepas de *L. reuteri* exibiram respostas distintas na modulação da resposta anti-inflamatória induzida por endotoxinas (Liu et al., 2010). Usando um modelo semelhante Michels et al. (2022), evidenciaram que microrganismos de espécies diferentes exibiram resultados diferenciados na forma como modulavam seus efeitos em resposta à inflamação. Neste estudo animais que receberam *B. Lactis* exibiram uma melhora no comportamento ansioso, efeito que não foi observado nos animais que receberam *L. reuteri* e *L. rhamnosus*. De maneira semelhante, um estudo avaliando o impacto de quatro espécies do gênero *Lactobacillus* divididas em 13 cepas diferentes no TDM, demonstrou que a maioria das cepas reverteu o comportamento do tipo depressivo em camundongos. Porém apenas 6 cepas induziram um aumento nos níveis de 5-HT no CF destes animais, três variedades de bactérias elevaram os níveis de BDNF no hipocampo e somente duas cepas foram capazes diminuir os níveis séricos de cortisol. Demonstrando que os efeitos antidepressivos exibidos por microrganismos usados neste estudo ocorreram por vias diferenciadas (Xu et al., 2022). Em animais expostos a PM e utilizando o mesmo probiótico do presente estudo Desbonnet et al. (2010), demonstraram o potencial de *B. infantis* na reversão dos sintomas associados ao TDM em ratos machos. Neste estudo o uso do probiótico foi relacionado com uma redução no tempo de imobilidade no teste do nado forçado em comparação com animais exposto ao PM, além disso nos roedores que receberam *B. infantis* houve normalização da resposta imune medida

pelos níveis séricos de IL-6 e IL-10 e restauração dos níveis de noradrenalina no SNC. Juntos, estes estudos expõem a complexidade pelas quais diferentes probióticos podem exercer seus efeitos na modulação dos sintomas associado aos TDM exibindo respostas diferentes, por meio de vias que podem ser dependentes do sexo, região cerebral analisada, bem como da espécie ou até mesmo da cepa de bactéria utilizada e podem em parte ajudar a explicar o efeito de *B. infantis* no aumento dos níveis de TrkB no CF de fêmeas conforme demonstrado no presente estudo.

O BDNF possui alta afinidade ao TrkB, e após a ligação com seu receptor induz a ativação do CREB, um fator de transcrição gênica que regula a produção de diversas proteínas envolvidas com sobrevivência celular, crescimento neuronal, neuroplasticidade além de induzir a produção de mais BDNF (Park e Poo, 2013; Lima Giacobbo et al., 2019). No presente estudo, não houve diferenças significativas em animais expostos a PM, nos níveis de BDNF em nenhuma das estruturas ou grupos analisados em 61 DPN (Figura 2). O papel neuroprotetor do BDNF é bem estabelecido (Park e Poo, 2013; Bathina e Das, 2015; Lima Giacobbo et al., 2019; Azman e Zakaria, 2022), do mesmo modo que sua relação com o TDM (Fomby e Cherlin, 2011; Arosio et al., 2021). Tem sido demonstrado que a PM reduz os níveis de BDNF tanto no CF quanto no hipocampo de roedores (Pinheiro et al., 2015; Chen e Baram, 2016; Waters e Gould, 2022), o que torna a compreensão da relação entre o uso de antidepressivos e a expressão desta proteína uma área de estudo interessante.

Foi demonstrado que o tratamento com escitalopram é capaz de normalizar os níveis séricos de BDNF em indivíduos com TDM (Cattaneo et al., 2010). Além disso, Seo et al. (2019) demonstraram que este fármaco é capaz de aumentar tanto os níveis de RNAm para BDNF quanto a concentração desta proteína no hipocampo de animais expostos a um modelo de estresse crônico. Adicionalmente, no mesmo estudo a administração de escitalopram foi capaz de normalizar os níveis séricos de cortisol nos animais bem como reverteu o comportamento do tipo depressivo. O tempo de tratamento com o escitalopram pode ter efeitos distintos na regulação dos níveis de BDNF. Em um estudo publicado por Alboni et al. (2010) foi demonstrado que inicialmente o escitalopram induziu um aumento nos níveis de BDNF no CF de ratos, efeito que foi revertido após o tratamento crônico que provocou uma redução desta proteína nesta região cerebral, o que foi acompanhado por uma diminuição nos níveis de BDNF também no hipocampo. Paradoxalmente, outro estudo demonstrou resultado contrário com redução dos níveis de BDNF no hipocampo de roedores após tratamento agudo com escitalopram e subsequente aumento na concentração desta proteína após o tratamento crônico (Młyniec e Nowak, 2015). Esses dados indicam que o efeito deste fármaco pode induzir

respostas variadas na modulação desta proteína, corroborando os dados encontrados no presente estudo.

A cetamina por sua vez está associada com um rápido aumento na liberação de glutamato, induzindo o aumento da liberação do BDNF e seus consequentes efeitos relacionados à neuroproteção (Gulyaeva, 2017), o que explica em parte seus efeitos antidepressivos (Ignácio et al., 2016; Huang, Lane e Lin, 2017). Foi demonstrado que a administração aguda de cetamina aumenta os níveis de BDNF no hipocampo de ratos (Garcia et al., 2008). Resultado semelhante foi encontrado em outro estudo onde a cetamina rapidamente aumentou os níveis de BDNF no CF de indivíduos após a administração de uma única dose (Woelfer et al., 2020). Por outro lado, foi evidenciado que o tratamento crônico com cetamina, embora tenha efeito antidepressivo, não altera os níveis de BDNF no hipocampo de ratos (Garcia et al., 2008b). Outro estudo demonstrou que a cetamina induz uma elevação nos níveis de BDNF dependente do tempo com um aumento nos níveis desta proteína no CF e hipocampo de ratos em até uma hora após a administração de cetamina, contudo seis hora após aplicação do fármaco ocorreu uma redução significativa nos níveis de BDNF no CF, hipocampo, amígdala e estriado desses animais, quando comparados com o grupo controle (Fraga et al., 2013). Esta disparidade de efeitos pode ser explicada pelo fato deste fármaco exibir respostas de maneira dose-dependente conforme demonstrado em estudo de Su et al. (2017), onde indivíduos com TDM grave que expressam um genótipo associado com baixa produção de BDNF, tiveram uma melhora significativa na redução de sintomas do TDM quando a cetamina foi aplicada em doses subclínicas, corroborando os dados de outro estudo, onde foi apontado que doses subclínicas de cetamina exercem maiores efeitos antidepressivos de maneira aguda, inclusive diminuindo a incidência de suicídio efeito que tende a ser atenuado ao longo do tratamento (Xu et al., 2016). Essas evidências dão suporte aos achados do presente estudo, no qual o tratamento crônico com cetamina não foi capaz de influenciar nos níveis de BDNF em animais expostos a PM.

No presente estudo o uso do probiótico *B. infantis* também não foi capaz de aumentar os níveis de BDNF no hipocampo e CF de ratos expostos a PM (Figura 2). Entretanto, já foi anteriormente demonstrado que este microrganismo exerce efeito positivo em diversos parâmetros associados ao TDM (Desbonnet et al., 2008, 2010). Inicialmente o uso de *B. infantis* foi associado com uma redução nas citocinas pró-inflamatórias, interferon-gama, IL-6 e TNF- α em sangue periférico e aumento do níveis plasmáticos de triptofano (Desbonnet et al., 2008). Posteriormente, também foi evidenciado o efeito deste probiótico na redução de sintomas associados ao comportamento depressivo em ratos expostos a um protocolo de PM (Desbonnet

et al., 2010). Conforme anteriormente exposto, os efeitos dos probióticos nos níveis de BDNF são variáveis e dependentes da espécie e até mesmo da cepa utilizada (Cheng et al., 2020). Sugerindo que outras vias podem estar associadas com os efeitos antidepressivos demonstradas após o uso terapêutico com esses microrganismos encontrados em outros estudos (Bravo et al., 2011; Evrensel e Ceylan, 2015; Rios et al., 2017; Bastiaanssen et al., 2020).

O papel do BDNF na ativação do TrkB já é bem estabelecido e em última instância a ativação deste receptor induz a ativação do CREB (Fišar e Hroudová, 2010; Fomby e Cherlin, 2011; Bathina e Das, 2015). Contudo, no presente estudo a elevação dos níveis de TrkB encontrado no CF de fêmeas expostas à PM e tratadas com *B. infantis* não foi acompanhada pela elevação dos níveis de BDNF e tampouco pelo aumento nos níveis de CREB. O que de fato ocorreu foi uma redução nos níveis desta proteína no CF das fêmeas expostas a PM tanto no grupo que recebeu salina quanto nos grupos expostos a PM que receberam tratamento com cetamina ou com probiótico (Figura 4). Adicionalmente, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis desta proteína em nenhuma das estruturas analisadas nos machos e no hipocampo das fêmeas. O TDM também tem sido relacionado com uma redução nos níveis de CREB (Rossetti et al., 2022). Em estudo recente foi demonstrado que animais com sintomas associados ao TDM após a utilização de um protocolo de estresse crônico também exibiram uma redução nos níveis de CREB no hipocampo, o que também foi associado com uma diminuição no número de neurônios nessa estrutura e conseqüente decréscimo nos níveis de BDNF e TrkB (Ji et al., 2022). Em outro estudo, o uso de um composto extraído da planta *Panax ginseng* exibiu efeitos antidepressivos revertendo os sintomas associados ao TDM em animais expostos ao estresse crônico, o que foi associado dentre outros fatores a normalização dos níveis de CREB no hipocampo destes animais (Wang et al., 2022).

No presente estudo, o tratamento com escitalopram não foi capaz de alterar os níveis de CREB. O uso deste fármaco apresenta resultados conflitantes em diferentes estudos. Młyniec e Nowak (2015), demonstraram que em roedores a utilização do tratamento agudo com escitalopram não foi capaz de reestabelecer os níveis normais de CREB no CF, entretanto houve um aumento dos níveis desta proteína após o tratamento prolongado com este antidepressivo. Já Alboni et al. (2010) encontrou um aumento nos níveis de CREB no CF de ratos tratados com escitalopram por sete dias, ao passo que a exposição prolongada do uso deste antidepressivo reduziu os níveis desta proteína tanto no CF quanto no hipocampo dos animais analisados. Esses resultados podem explicar os dados do presente estudo, onde foi usado tratamento crônico.

No presente estudo, a cetamina reduziu os níveis de CREB no CF de fêmeas expostas à PM, efeito que não foi observado no hipocampo, já os machos tratados com

cetamina, não exibiram efeitos significativos em nenhuma estrutura. Em estudo conduzido por Réus et al. (2016b), a cetamina elevou os níveis de CREB no CF de ratos machos, porém provocou uma redução na concentração desta proteína no hipocampo destes animais. Em outro estudo, o uso prolongado de cetamina também provocou uma redução nos níveis de CREB no hipocampo de camundongos machos, o que foi associado com déficit cognitivo e uma diminuição nos receptores glutamatérgicos nestes animais (Luo et al., 2021). Em um trabalho avaliando o uso da cetamina em ratas grávidas, foi encontrada uma diminuição nos níveis de CREB na prole, o que foi associado com impactos negativos no aprendizado e memória, juntamente com uma redução neuronal no hipocampo (Li et al., 2017). Por outro lado, foi demonstrado que a cetamina, apresenta efeito neuroprotetor no hipocampo de camundongos após indução de apoptose por administração intracerebroventricular de TNF- α (Wang et al., 2021). Juntos esses dados expõem que a indicação do uso da cetamina deve ser realizada de maneira criteriosa respeitando o histórico médico dos indivíduos afetados, haja visto que o uso contínuo deste fármaco não está livre de efeitos colaterais indesejados.

Estudos científicos também têm apontado que a microbiota intestinal pode exercer seus efeitos regulando os níveis cerebrais da proteína CREB. Em outro estudo também com ratas grávidas, a exposição pré-natal a um modelo de estresse crônico, aumentou os níveis de corticosterona, diminuiu o ganho de peso durante a gestação, bem como induziu comportamento do tipo depressivo (Zhao et al., 2022). Efeitos comportamentais similares foram encontrados na prole, juntamente com elevação dos níveis de corticosteroides. Além disso, os autores também demonstraram que o estresse pré-natal foi capaz de alterar a microbiota dos filhotes, o que foi representado por uma redução na população intestinal de bactérias da família Lactobacillaceae que foram substituídas por bactérias da família Muribaculaceae, fato que também foi associado, com uma redução nos níveis cerebrais de BDNF, TrkB e CREB (Zhao et al., 2022).

Quando o receptor TrkB é ativado, ele regula vias que estimulam a liberação do CREB (Huang e Reichardt, 2001; Fomby e Cherlin, 2011; Giacobbo et al., 2019). Porém, no presente trabalho o aumento dos níveis de TrkB no CF das fêmeas tratadas com *B. infantis* foi acompanhada por uma redução dos níveis deste fator de transcrição. Além disso não houve impacto nas concentrações de BDNF, sugerindo que o aumento dos níveis de TrkB pode ter ocorrido por outras vias. Além do BDNF, também tem sido demonstrado que a neurotrofina 4 (NT-4) se liga ao TrkB, induzindo os efeitos neuroprotetivos associados a ativação deste receptor (Cheng et al., 2020). De maneira interessante, um estudo demonstrou que animais que produzem 50% menos BDNF, ocorre um aumento nos níveis de TrkB no CF, hipocampo e

estriado de ratos machos, o que foi correlacionado com um aumento significativo de NT-4 no estriado desses roedores (Hill e Van Den Buuse, 2011).

Em um outro trabalho foi comparada a performance do BDNF e da NT-4 na ativação e regulação do receptor TrkB (Proenca et al., 2016). O estudo apontou que a proteína NT-4 tem eficácia semelhante ao BDNF, tanto na ativação do TrkB quanto na endocitose deste receptor. Adicionalmente, o mesmo estudo demonstrou que o BDNF induz índices maiores de ubiquitinação, aumentando a velocidade de degradação do TrkB, e consequentemente reduzindo a sua biodisponibilidade de maneira muito mais acelerada quando a ativação do TrkB ocorre via NT-4. Também foi demonstrado, que a NT-4 induz índices maiores de fosforilação de proteínas associadas ao TrkB, principalmente pela redução da velocidade de degradação deste receptor (Proenca et al., 2016).

Para além desses dados, um estudo analisando cérebros *post mortem* de indivíduos com TDM que cometeram suicídio, apontou uma redução nos níveis de NT-4 tanto no CF quanto no hipocampo, quando comparado com indivíduos saudáveis (Dwivedi et al., 2005). Evidenciando que existe uma relação desta proteína com o TDM. Estes achados sugerem que a elevação dos níveis de TrkB, acompanhada de subsequente redução dos níveis de CREB, e sem alterações significativas nas concentrações de BDNF no CF de fêmeas tratadas com *B infantis*, pode ter ocorrido por vias alternativas associadas com uma possível elevação de NT-4.

Por fim, no presente estudo, só ocorreram diferenças significativas no CF das fêmeas, enquanto os machos não apresentaram alterações. Conforme evidenciado na literatura, as mulheres são mais susceptíveis ao TDM (Kessler, 2011; Avenevoli et al., 2015). O que tem sido correlacionado com diferenças sexuais na síntese e neurotransmissão de 5-HT (Jovanovic et al., 2008), bem como com o papel hormonal no estabelecimento do TDM, uma vez que a testosterona exibe efeitos antidepressivos em ambos os sexos (McHery et al., 2014). As neurotrofinas também induzem respostas diferenciadas em machos e fêmeas, de acordo com Monteggia e Björkholm (2016), a redução nos níveis de BDNF causa hiperatividade em machos, enquanto induz o aparecimento de comportamento do tipo depressivo nas fêmeas. O fato de no presente estudo os níveis de TrkB e CREB estarem alterados somente nas fêmeas expostas à PM, pode em parte ser explicado por essas diferenças dependentes do sexo que ocorrem no desenvolvimento do TDM.

Os dados obtidos no presente estudo abrem margem para novos questionamentos, com vistas para trabalhos que explorem a regulação dos níveis de neurotrofinas exibidas pela cetamina e *B. infantis* em fêmeas, e sua possível relação com os efeitos da microbiota intestinal no TDM.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo foi demonstrado que em animais expostos à PM, o uso do probiótico *B. infantis* foi capaz de alterar os níveis do receptor TrkB no CF de fêmeas em 61 DPN. A PM, provocou uma redução nos níveis da proteína CREB quando comparado ao grupo controle no CF das fêmeas. Os níveis deste fator de transcrição permaneceram reduzidos nas fêmeas tratadas com cetamina ou *B. infantis*, mas não com escitalopram. Estas alterações não foram observadas no hipocampo das fêmeas.

Nos machos, não houve alterações dos níveis de BDNF, TrkB e CREB em nenhum dos grupos analisados. Estes resultados abrem margem para outros estudos que explorem os possíveis fatores envolvidos na exibição de respostas diferentes nos níveis de TrkB e CREB entre machos e fêmeas, expostos à PM. Além disso, o envolvimento de *B. infantis* na via BDNF/TrkB/CREB, no CF das fêmeas pode ajudar em parte a elucidar como os probióticos desta espécie exibem seus efeitos antidepressivos.

Por fim, mais estudos que investiguem os efeitos de *B. infantis* e outros probióticos na regulação dos níveis das neurotrofinas, especialmente por vias alternativas, com enfoque em outras proteínas como o NT-4, são necessários para aumentar a compreensão do envolvimento da microbiota intestinal e o TDM.

REFERÊNCIAS

- Abelaira HM, Réus GZ, Neotti M V., Quevedo J. The role of mTOR in depression and antidepressant responses. *Life Sci.* 2014;101(1–2):10–4.
- Abelaira HM, Reus GZ, Quevedo J, Abelaira HM, Reus GZ, Quevedo J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Rev Bras Psiquiatr.* 2013 [cited 2020 Jul 11];35(suppl 2):S112–20.
- Ader R, Tatum R, Beels CC. Social factors affecting emotionality and resistance to disease in animals: I. Age of separation from the mother and susceptibility to gastric ulcers in the rat. *J Comp Physiol Psychol.* 1960;53(5):446–54.
- Agid O, Shapira B, Zislin J, Ritsner M, Hanin B, Murad H, et al. Environment and vulnerability to major psychiatric illness: A case control study of early parental loss in major depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 1999;4(2):163–72.
- Akkasheh G, Kashani-Poor Z, Tajabadi-Ebrahimi M, Jafari P, Akbari H, Taghizadeh M, et al. Clinical and metabolic response to probiotic administration in patients with major depressive disorder: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition.* 2016;32(3):315–20.
- Alam R, Abdolmaleky HM, Zhou JR. Microbiome, inflammation, epigenetic alterations, and mental diseases. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet.* 2017;174(6):651–60.
- Alboni S, Benatti C, Capone G, Corsini D, Caggia F, Tascetta F, et al. Time-dependent effects of escitalopram on brain derived neurotrophic factor (BDNF) and neuroplasticity related targets in the central nervous system of rats. *Eur J Pharmacol.* 2010;643(2–3):180–7.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. DSM-V: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- Anisman H, Zaharia MD, Meaney MJ, Merali Z. Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *Int J Dev Neurosci.* 1998;16(3–4):149–64.
- Arosio B, Guerini FR, Voshaar RCO, Aprahamian I. Blood Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Major Depression: Do We Have a Translational Perspective? *Front Behav Neurosci.* 2021;15(February):1–14.
- Avenevoli, Swendsen, He, Burstein, & Merikangas 2015. HHS Public Access. *Physiol Behav.* 2015;176(3):139–48.
- Azman KF, Zakaria R. Recent Advances on the Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 2022;23(12):6827.
- Barbosa Neto JB, Tiba PA, Faturi CB, De Castro-Neto EF, Da Graa Naffah-Mazacoratti M, De Jesus Mari J, et al. Stress during development alters anxiety-like behavior and hippocampal neurotransmission in male and female rats. *Neuropharmacology.* 2012;62(1):518–26.
- Bastiaanssen TFS, Cusotto S, Claesson MJ, Clarke G, Dinan TG, Cryan JF. Gutted!

Unraveling the Role of the Microbiome in Major Depressive Disorder. *Harv Rev Psychiatry*. 2020;28(1):26–39.

Bathina S, Das UN. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical Implications. *Arch Med Sci*. 2015;11(6):1164–78.

Berg L, Rostila M, Hjern A. Parental death during childhood and depression in young adults – a national cohort study. *J Child Psychol Psychiatry Allied Discip*. 2016;57(9):1092–8.

Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*. 2000;47(4):351–4.

Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab*. 2012;61(2):160–74.

Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: Beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(2):137–51.

Bessa JM, Ferreira D, Melo I, Marques F, Cerqueira JJ, Palha JA, et al. The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. *Mol Psychiatry*. 2009;14(8):764–73.

Bistoletti M, Caputi V, Baranzini N, Marchesi N, Filpa V, Marsilio I, et al. Antibiotic treatment-induced dysbiosis differently affects BDNF and TrkB expression in the brain and in the gut of juvenile mice. *PLoS One*. 2019;14(2):1–20.

Bravo JA, Forsythe P, Chew M V., Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(38):16050–5.

Bressan RA, Pilowsky LS. Glutamatergic hypothesis of schizophrenia. *Rev Bras Psiquiatr*. 2003;25(3):177–83.

Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. 2007;56(July):1761–72.

Carlessi AS. Efeitos do tratamento com escitalopram, cetamina e probiótico sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos ao longo do desenvolvimento de ratos machos e fêmeas submetidos a privação materna. Criciúma. [Tese Doutorado]. Programa de pós-graduação em ciências da saúde. Criciúma. Universidade do extremo sul catarinense; 2021.

Carlessi AS, Borba LA, Zugno AI, Quevedo J, Réus GZ. Gut microbiota–brain axis in depression: The role of neuroinflammation. *Eur J Neurosci*. 2021;53(1):222–35.

Carrillo P, Petit AC, Gaillard R VF. The next psychoactive drugs: From imipramine to ketamine. *Ann Oncol*. 2020;(January):2–5.

Cattaneo A, Bocchio-Chiavetto L, Zanardini R, Milanesi E, Placentino A, Gennarelli M. Reduced peripheral brain-derived neurotrophic factor mRNA levels are normalized by antidepressant treatment. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2010;13(1):103–8.

Celano CM, Villegas AC, Albanese AM, Gaggin HK, Huffman JC. Depression and Anxiety in Heart Failure: A Review. *Harv Rev Psychiatry*. 2018;26(4):175–84.

Chaki S. Beyond Ketamine: New Approaches to the Development of Safer Antidepressants. *Curr Neuropharmacol*. 2017;15(7):963–76.

Champagne FA, Francis DD, Mar A, Meaney MJ. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol Behav*. 2003;79(3):359–71.

Chen L, Li XS, Zheng GE, Xie GJ, Cheng Y. Peripheral blood BDNF-TrkB signaling in first-episode, drug-free patients with major depressive disorder and schizophrenia. *Neurosci Lett*. 2020;714(April 2019):134618.

Chen R, Xu Y, Wu P, Zhou H, Lasanajak Y, Fang Y, et al. Transplantation of fecal microbiota rich in short chain fatty acids and butyric acid treat cerebral ischemic stroke by regulating gut microbiota. *Pharmacol Res*. 2019 Oct 1;148:104403.

Chen Y, Baram TZ. Toward understanding how early-life stress reprograms cognitive and emotional brain networks. *Neuropsychopharmacology*. 2016;41(1):197–206.

Cheng R, Xu T, Zhang Y, Wang F, Zhao L, Jiang Y, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium bifidum* TMC3115 Can Affect Development of Hippocampal Neurons Cultured In Vitro in a Strain-Dependent Manner. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2020;12(2):589–99.

Chesney E, Goodwin GM, Fazel S. Risks of all-cause and suicide mortality in mental disorders: A meta-review. *World Psychiatry*. 2014;13(2):153–60.

Chow W, Doane MJ, Sheehan J, Alphas L, Le H. Economic burden among patients with major depressive disorder: An analysis of healthcare resource use, work productivity, and direct and indirect costs by depression severity. *Am J Manag Care*. 2019;February:1–3.

Cipriani A, Furukawa TA, Salanti G, Chaimani A, Atkinson LZ, Ogawa Y, et al. Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet*. 2018;391(10128):1357–66.

Contó MB, Pautassi RM, Camarini R. Rewarding and Antidepressant Properties of Ketamine and Ethanol: Effects on the Brain-Derived Neurotrophic Factor and TrkB and p75NTR Receptors. *Neuroscience*. 2022;493:1–14.

Cryan JF, Dinan TG. Gut microbiota: Microbiota and neuroimmune signalling - Metchnikoff to microglia. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12(9):494–6.

Danese A, J Lewis S. Psychoneuroimmunology of Early-Life Stress: The Hidden Wounds of Childhood Trauma. *Neuropsychopharmacology*. 2017;42(1):99–114.

Dandekar MP, Palepu MSK, Satti S, Jaiswal Y, Singh AA, Dash SP, et al. Multi-strain Desbonnet L, Clarke G, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota is essential for social

development in the mouse. *Mol Psychiatry*. 2014;19(2):146–8.

Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Bienenstock J, Dinan TG. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *J Psychiatr Res*. 2008;43(2):164–74.

Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Kiely B, Cryan JF, Dinan TG. Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. *Neuroscience*. 2010;170(4):1179–88.

Dey A, Giblin PAH. Insights into macrophage heterogeneity and cytokine-induced neuroinflammation in major depressive disorder. *Pharmaceuticals*. 2018;11(3).

Dinan TG, Cryan JF. Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *J Physiol*. 2017;595(2):489–503.

Dong W, Xu D, Hu Z, He X, Guo Z, Jiao Z, et al. Low-functional programming of the CREB/BDNF/TrkB pathway mediates cognitive impairment in male offspring after prenatal dexamethasone exposure. *Toxicol Lett*. 2018 Feb;283:1–12.

Doran CM, Kinchin I. A review of the economic impact of mental illness. *Aust Heal Rev*. 2019;43(1):43–8. Probiotic Formulation Reverses Maternal Separation and Chronic Unpredictable Mild Stress-Generated Anxiety- and Depression-like Phenotypes by Modulating Gut Microbiome–Brain Activity in Rats. *ACS Chem Neurosci*. 2022;

Dwivedi Y, Mondal AC, Rizavi HS, Conley RR. Suicide brain is associated with decreased expression of neurotrophins. *Biol Psychiatry*. 2005;58(4):315–24.

Edinoff AN, Akuly HA, Hanna TA, Ochoa CO, Patti SJ, Ghaffar YA, et al. Selective serotonin reuptake inhibitors and adverse effects: A narrative review. *Neurol Int*. 2021;13(3):387–401.

Elaine Y. Hsiao, Sara W. McBride, Sophia Hsien, Gil Sharon, Embriette R. Hyde, Tyler McCue, et al. The microbiota modulates gut physiology and behavioral abnormalities associated with autism. *Cell*. 2014;155(7):1451–63.

Evrensel A, Ceylan ME. The gut-brain axis: The missing link in depression. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2015;13(3):239–44.

Fakhoury M. New insights into the neurobiological mechanisms of major depressive disorders. *Gen Hosp Psychiatry*. 2015;37(2):172–7.

Fang F, Godlewska B, Cho RY, Savitz SI, Selvaraj S, Zhang Y. Effects of escitalopram therapy on functional brain controllability in major depressive disorder. *J Affect Disord*. 2022;310(April):68–74.

Fišar Z, Hroudová J. Intracellular signalling pathways and mood disorders. *Folia Biol (Praha)*. 2010;56(4):135–48.

Fleshner M, Frank M, Maier SF. Danger Signals and Inflammasomes: Stress-Evoked Sterile Inflammation in Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2017;42(1):36–45.

Fomby P, Cherlin AJ. The Role of Neurotrophins in Major Depressive Disorder. *Transl Neurosci*. 2011;72(2):181–204.

Forsythe P, Sudo N, Dinan T, Taylor VH, Bienenstock J. Mood and gut feelings. *Brain Behav Immun*. 2010;24(1):9–16.

Foster JA, McVey Neufeld KA. Gut-brain axis: How the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci*. 2013;36(5):305–12.

Fraga DB, Réus GZ, Abelaira HM, De Luca RD, Canevar L, Pfaffenseller B, et al. Ketamine alters behavior and decreases BDNF levels in the rat brain as a function of time after drug administration. *Rev Bras Psiquiatr*. 2013;35(3):262–6.

Franklin TC, Xu C, Duman RS. Depression and sterile inflammation: Essential role of danger associated molecular patterns. *Brain Behav Immun*. 2018;72:2–13.

Freed RD, Hollenhorst C, Weiduschat N, Mao X, Kang G, Shungu DC, et al. A pilot study of cortical glutathione in youth with depression. *Psychiatry Res - Neuroimaging*. 2017;270:54–60.

Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9(5):286–94.

Garcia LS, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Andreazza AC, Stertz L, et al. Chronic administration of ketamine elicits antidepressant-like effects in rats without affecting hippocampal brain-derived neurotrophic factor protein levels. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008;103(6):502–6.

Garcia LSB, Comim CM, Valvassori SS, Réus GZ, Barbosa LM, Andreazza AC, et al. Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2008;32(1):140–4.

Geschwind DH, Flint J. Genetics and genomics of psychiatric disease. *Science* (80-). 2015;349(6255):1489–94.

Gray AL, Hyde TM, Deep-Soboslay A, Kleinman JE, Sodhi MS. Sex differences in glutamate receptor gene expression in major depression and suicide. *Mol Psychiatry*. 2015;20(9):1057–68.

Gu F, Wu Y, Liu Y, Dou M, Jiang Y, Liang H. *Lactobacillus casei* improves depression-like behavior in chronic unpredictable mild stress-induced rats by the BDNF-TrkB signal pathway and the intestinal microbiota. *Food Funct*. 2020;11(7):6148–57.

Gulyaeva N V. Interplay between brain BDNF and glutamatergic systems: A brief state of the evidence and association with the pathogenesis of depression. *Biochem*. 2017;82(3):301–7.

Gur TL, Shay L, Palkar AV, Fisher S, Varaljay VA, Dowd S, et al. Prenatal stress affects placental cytokines and neurotrophins, commensal microbes, and anxiety-like behavior in adult

female offspring. *Brain Behav Immun*. 2017;64:50–8.

Gwag BJ, Springer JE. Activation of NMDA receptors increases brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in the hippocampal formation. *Neuroreport*. 1993 Nov 18;5(2):125-8.

Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014; 11(8): 506-514.

Hill RA, Van Den Buuse M. Sex-dependent and region-specific changes in TrkB signaling in BDNF heterozygous mice. *Brain Res*. 2011;1384:51–60.

Hing B, Sathyaputri L, Potash JB. A comprehensive review of genetic and epigenetic mechanisms that regulate BDNF expression and function with relevance to major depressive disorder. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet*. 2018;177(2):143–67.

Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:677–736.

Huang YJ, Lane HY, Lin CH. New Treatment Strategies of Depression: Based on Mechanisms Related to Neuroplasticity. *Neural Plast*. 2017;2017.

Ignácio ZM, Réus GZ, Arent CO, Abelaira HM, Pitcher MR, Quevedo J. New perspectives on the involvement of mTOR in depression as well as in the action of antidepressant drugs. *Br J Clin Pharmacol*. 2016;1280–90.

Jeon SW, Kim YK. The role of neuroinflammation and neurovascular dysfunction in major depressive disorder. *J Inflamm Res*. 2018;11:179–92.

Ji CH, Gu JH, Liu Y, Tang WQ, Guan W, Huang J, et al. Hippocampal MSK1 regulates the behavioral and biological responses of mice to chronic social defeat stress: Involving of the BDNF-CREB signaling and neurogenesis. *Biochem Pharmacol*. 2022;195(November 2021):114836.

Jiang DG, Jin SL, Li GY, Li QQ, Li ZR, Ma HX, et al. Serotonin regulates brain-derived neurotrophic factor expression in select brain regions during acute psychological stress. *Neural Regen Res*. 2016;11(9):1471–9.

Jobst A, Brakemeier EL, Buchheim A, Caspar F, Cuijpers P, Ebmeier KP, et al. European Psychiatric Association Guidance on psychotherapy in chronic depression across Europe. *Eur Psychiatry*. 2016;33:18–36.

Johnston DA, Harvey SB, Glozier N, Calvo RA, Christensen H, Deady M. The relationship between depression symptoms, absenteeism and presenteeism. *J Affect Disord*. 2019;256(June):536–40.

Jovanovic H, Lundberg J, Karlsson P, Cerin Å, Saijo T, Varrone A, et al. Sex differences in the serotonin 1A receptor and serotonin transporter binding in the human brain measured by PET.

Neuroimage. 2008;39(3):1408–19.

Kemp KM, Colson J, Lorenz RG, Maynard CL, Pollock JS. Early life stress in mice alters gut microbiota independent of maternal microbiota inheritance. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2021;320(5):R663–74.

Kim YK, Won E. The influence of stress on neuroinflammation and alterations in brain structure and function in major depressive disorder. *Behav Brain Res*. 2017;329(February):6–11.

Knol MJ, Twisk JWR, Beekman ATF, Heine RJ, Snoek FJ, Pouwer F. Depression as a risk factor for the onset of type 2 diabetes mellitus. A meta-analysis. *Diabetologia*. 2006;49(5):837–45.

Kozisek ME, Middlemas D, Bylund DB. The differential regulation of BDNF and TrkB levels in juvenile rats after four days of escitalopram and desipramine treatment. *Neuropharmacology*. 2008;54(2):251–7.

Kundakovic M, Gudsnuk K, Herbstman JB, Tang D, Perera FP, Champagne FA. DNA methylation of BDNF as a biomarker of early-life adversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jun 2;112(22):6807–13.

Kupferberg A, Bicks L, Hasler G. Social functioning in major depressive disorder. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016;69:313–32.

Larsen KG, Kennedy SH, Reines EH, Thase ME. Patient Response Trajectories in Major Depressive Disorder. *Psychopharmacol Bull*. 2020;50(4):8–28.

Lautarescu A, Craig MC, Glover V. Prenatal stress: Effects on fetal and child brain development. *Int Rev Neurobiol* [Internet]. 1st ed. 2020;150:17–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.irm.2019.11.002>

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

Li N, Wang Q, Wang Y, Sun A, Lin Y, Jin Y, et al. Fecal microbiota transplantation from chronic unpredictable mild stress mice donors affects anxiety-like and depression-like behavior in recipient mice via the gut microbiota-inflammation-brain axis. *Stress*. 2019;22(5):592–602.

Li X, Guo C, Li Y, Li L, Wang Y, Zhang Y, et al. Ketamine administered pregnant rats impair learning and memory in offspring via the CREB pathway. *Oncotarget*. 2017;8(20):32433–49.

Liang S, Wang T, Hu X, Luo J, Li W, Wu X, et al. Administration of *Lactobacillus helveticus* NS8 improves behavioral, cognitive, and biochemical aberrations caused by chronic restraint stress. *Neuroscience*. 2015;310:561–77.

Lima Giacobbo B, Doorduyn J, Klein HC, Dierckx RAJO, Bromberg E, de Vries EFJ. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. *Mol Neurobiol*. 2019;56(5):3295–312.

Lindsay RM, Wiegand SJ, Anthony Altar C, DiStefano PS. Neurotrophic factors: from molecule to man. *Trends Neurosci.* 1994;17(5):182–90.

Liu Q, He H, Yang J, Feng X, Zhao F, Lyu J. Changes in the global burden of depression from 1990 to 2017: Findings from the Global Burden of Disease study. Vol. 126, *Journal of Psychiatric Research.* 2020. p. 134–40.

Liu Y, Fatheree NY, Mangalat N, Rhoads JM. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* strains differentially reduce intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;299:1087–96.

Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med.* 2016;8(1):1–11.

Lohoff FW. Overview of the genetics of major depressive disorder. *Curr Psychiatry Rep.* 2010;12(6):539–46.

Lowry, OH. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

Luo Y, Yu Y, Zhang M, He H, Fan N. Chronic administration of ketamine induces cognitive deterioration by restraining synaptic signaling. *Mol Psychiatry.* 2021;26(9):4702–18.

Macedo D, Barichello T, Lucena DF De. *crossmark.* 2017;208(September 2016):22–32.

Malhi GS, Mann JJ. Depression. *Lancet.* 2018;392(10161):2299–312.

Massart R, Mongeau R, Lanfumey L. Beyond the monoaminergic hypothesis: Neuroplasticity and epigenetic changes in a transgenic mouse model of depression. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2012;367(1601):2485–94.

McHery J, Carrier N, Hull E, Kabbaj M. Sex Differences in Anxiety and Depression: Role of Testosterone. *Front neuroendoc Rinol.* 2014;35(1):42–57.

Messaoudi M, Lalonde R, Violle N, Javelot H, Desor D, Nejdj A, et al. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *Br J Nutr.* 2011;105(5):755–64.

Michels M, Jesus GFA, Abatti MR, Córneo E, Cucker L, de Medeiros Borges H, et al. Effects of different probiotic strains *B. lactis*, *L. rhamnosus* and *L. reuteri* on brain-intestinal axis immunomodulation in an endotoxin-induced inflammation. *Mol Neurobiol.* 2022;(0123456789).

Młyniec K, Nowak G. Up-regulation of the GPR39 Zn(2+)-sensing receptor and CREB/BDNF/TrkB pathway after chronic but not acute antidepressant treatment in the frontal cortex of zinc-deficient mice. *Pharmacol Reports.* 2015;67(6):1135–40.

Mohammadi A, Amoeian VG, Rashidi E. Dysfunction in Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling Pathway and Susceptibility to Schizophrenia, Parkinson's and Alzheimer's Diseases. *Curr Gene Ther.* 2018;18:45–63.

Monteggia LM, Björkholm C. BDNF - a key transducer of antidepressant effects.

Neuropharmacology. 2016;102:72–9

Morais M, Patrício P, Mateus-Pinheiro A, Alves ND, MacHado-Santos AR, Correia JS, et al. The modulation of adult neuroplasticity is involved in the mood-improving actions of atypical antipsychotics in an animal model of depression. *Transl Psychiatry*. 2017;7(6):1–9.

Morshedi M, Saghafi-Asl M, Hosseinifard ES. The potential therapeutic effects of the gut microbiome manipulation by synbiotic containing-Lactobacillus plantarum on neuropsychological performance of diabetic rats. *J Transl Med*. 2020;18(1):1–14.

Murakami T, Kamada K, Mizushima K, Higashimura Y, Katada K, Uchiyama K, et al. Changes in Intestinal Motility and Gut Microbiota Composition in a Rat Stress Model. *Digestion*. 2017;95(1):55–60.

Nandam LS, Brazel M, Zhou M, Jhaveri DJ. Cortisol and Major Depressive Disorder—Translating Findings From Humans to Animal Models and Back. *Front Psychiatry*. 2020;10(January):1–15.

Nandwana V, Nandwana NK, Das Y, Saito M, Panda T, Das S, et al. The Role of Microbiome in Brain Development and Neurodegenerative Diseases. *Molecules*. 2022;27(11):3402.
Negrão AB, Gold PW. Major Depressive Disorder. *Encycl Stress*. 2007;28:640–5.

Ng C, Sarris J, Singh A, Bousman C, Byron K, Peh LH, et al. Pharmacogenetic polymorphisms and response to escitalopram and venlafaxine over 8 weeks in major depression. *Hum Psychopharmacol Clin Exp*. 2013;28:516–22.

Nguyen QN, Himes JE, Martinez DR, Permar SR. The Impact of the Gut Microbiota on Humoral Immunity to Pathogens and Vaccination in Early Infancy. *PLoS Pathog*. 2016;12(12):1–6.

O’Mahony SM, Marchesi JR, Scully P, Codling C, Ceolho AM, Quigley EMM, et al. Early Life Stress Alters Behavior, Immunity, and Microbiota in Rats: Implications for Irritable Bowel Syndrome and Psychiatric Illnesses. *Biol Psychiatry*. 2009;65(3):263–7.

Oomen CA, Girardi CEN, Cahyadi R, Verbeek EC, Krugers H, Joëls M, et al. Opposite effects of early maternal deprivation on neurogenesis in male versus female rats. *PLoS One*. 2009;4(1).

Orsolini L, Pompili S, Valenta ST, Salvi V, Volpe U. C-Reactive Protein as a Biomarker for Major Depressive Disorder? *Int J Mol Sci*. 2022;23(3).

Otte C, Gold SM, Penninx BW, Pariante CM, Etkin A, Fava M, et al. Major depressive disorder. *Nat Rev Dis Prim*. 2016;2(Mdd):1–21.

Park H, Poo MM. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(1):7–23.

Phillips C. Brain-Derived Neurotrophic Factor, Depression, and Physical Activity: Making the Neuroplastic Connection. *Neural Plast*. 2017;2017.

Pinheiro RMC, de Lima MNM, Portal BCD, Busato SB, Falavigna L, Ferreira RDP, et al. Long-

lasting recognition memory impairment and alterations in brain levels of cytokines and BDNF induced by maternal deprivation: effects of valproic acid and topiramate. *J Neural Transm.* 2015;122(5):709–19.

Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. Mechanisms of Action of Probiotics. *Adv Nutr.* 2019;10:S49–66.

Proenca CC, Song M, Lee FS. Differential effects of BDNF and neurotrophin 4 (NT4) on endocytic sorting of TrkB receptors. *J Neurochem.* 2016;138(3):397–406.

Pusceddu MM, El Aidy S, Crispie F, O'Sullivan O, Cotter P, Stanton C, et al. N-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) reverse the impact of early-life stress on the gut microbiota. *PLoS One.* 2015;10(10):1–13.

Qaseem A, Barry MJ, Kansagara D, Forcica MA, Denberg TD, Boyd C, et al. Nonpharmacologic versus pharmacologic treatment of adult patients with major depressive disorder: A clinical practice guideline from the American College of Physicians. *Ann Intern Med.* 2016;164(5):350–9.

Rabot S, Membrez M, Bruneau A, Gérard P, Harach T, Moser M, et al. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *FASEB J.* 2010;24(12):4948–59.

Rajilić-Stojanović M, de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev.* 2014;38(5):996–1047.

Ramic E, Prasko S, Gavran L, Spahic E. Assessment of the Antidepressant Side Effects Occurrence in Patients Treated in Primary Care. *Mater Socio Medica.* 2020;32(2):131.

Réus GZ, Abaleira HM, Titus SE, Arent CO, Michels M, Da Luz JR, et al. Effects of ketamine administration on the phosphorylation levels of CREB and TrkB and on oxidative damage after infusion of MEK inhibitor. *Pharmacol Reports.* 2016b;68(1):177–84.

Réus GZ, Carlessi AS, Silva RH, Ceretta LB, Quevedo J. Relationship of oxidative stress as a link between diabetes mellitus and major depressive disorder. *Oxid Med Cell Longev.* 2019.

Réus GZ, dos Santos MAB, Abelaira HM, Ribeiro KF, Petronilho F, Vuolo F, et al. Imipramine reverses alterations in cytokines and BDNF levels induced by maternal deprivation in adult rats. *Behav Brain Res.* 2013;242(1):40–6.

Réus GZ, Fernandes GC, de Moura AB, Silva RH, Darabas AC, de Souza TG, et al. Early life experience contributes to the developmental programming of depressive-like behaviour, neuroinflammation and oxidative stress. *J Psychiatr Res.* 2017;95:196–207.

Réus GZ, Nacif MP, Abelaira HM, Tomaz DB, dos Santos MAB, Carlessi AS, et al. Ketamine ameliorates depressive-like behaviors and immune alterations in adult rats following maternal deprivation. *Neurosci Lett.* 2015;584:83–7.

Réus GZ, Stringari RB, Ribeiro KF, Cipriano AL, Panizzutti BS, Stertz L, et al. Maternal deprivation induces depressive-like behaviour and alters neurotrophin levels in the rat brain.

Neurochem Res. 2011;36(3):460–6.

Réus GZ, Titus SE, Abelaira HM, Freitas SM, Tuon T, Quevedo J, et al. Neurochemical correlation between major depressive disorder and neurodegenerative diseases. *Life Sci.* 2016a;158:121–9.

Rhee SH, Pothoulakis C, Mayer EA. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2009;6(5):306–14.

Rios AC, Maurya PK, Pedrini M, Zeni-Graiff M, Asevedo E, Mansur RB, et al. Microbiota abnormalities and the therapeutic potential of probiotics in the treatment of mood disorders. *Rev Neurosci.* 2017;28(7):739–49.

Ronald C. Kessler P. Fan Li1, Jennifer Greif Green2, Ronald C. KessAge Differences in Major depression: Results from the National Comorbidity Surveys Replication (NCS-R). 2011;40(2):1–18.

Rosenblat JD, Lee Y, McIntyre RS. The effect of pharmacogenomic testing on response and remission rates in the acute treatment of major depressive disorder: A meta-analysis. *J Affect Disord.* 2018;241:484–91.

Rossetti C, Cherix A, Guiraud LF, Cardinaux JR. New Insights Into the Pivotal Role of CREB-Regulated Transcription Coactivator 1 in Depression and Comorbid Obesity. *Front Mol Neurosci.* 2022;15(February):1–18.

Rush JA, Trivedi MH, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Stewart JW, Warden D, et al. STAR-D (2006; *AjPsych*) Tiered approach for depression. *Am J Psychiatry.* 2006;163(11):1905–17.

Saeed NK, Al-Beltagi M, Bediwy AS, El-Sawaf Y, Toema O. Gut microbiota in various childhood disorders: Implication and indications. *World J Gastroenterol.* 2022;28(18):1875–901.

Seo MK, Lee JG, Park SW. Effects of escitalopram and ibuprofen on a depression-like phenotype induced by chronic stress in rats. *Neurosci Lett.* 2019;696(December 2018):168–73.

Smith LM, Parr-Brownlie LC. A neuroscience perspective of the gut theory of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci.* 2019;49(6):817–23.

Steenbergen L, Sellaro R, van Hemert S, Bosch JA, Colzato LS. A randomized controlled trial to test the effect of multispecies probiotics on cognitive reactivity to sad mood. *Brain Behav Immun.* 2015;48:258–64.

Stuart SA, Hinchcliffe JK, Robinson ESJ. Evidence that neuropsychological deficits following early life adversity may underlie vulnerability to depression. *Neuropsychopharmacology.* 2019;44(9):1623–30.

Su TP, Chen MH, Li CT, Lin WC, Hong CJ, Gueorguieva R, et al. Dose-related effects of adjunctive ketamine in taiwanese patients with treatment-resistant depression. *Neuropsychopharmacology.* 2017;42(13):2482–92.

Sudo N. Stress and gut microbiota: Does postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response? *Int Congr Ser.* 2006;1287:350–4.

Sugaya N, Izawa S, Saito K, Shirotaki K, Nomura S, Shimada H. Effect of prolonged stress on the adrenal hormones of individuals with irritable bowel syndrome. *Biopsychosoc Med.* 2015;9(1):1–9.

Sun X, Zhang HF, Ma CL, Wei H, Li BM, Luo J. Alleviation of Anxiety/Depressive-Like Behaviors and Improvement of Cognitive Functions by *Lactobacillus plantarum* WLPL04 in Chronically Stressed Mice. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2021;2021.

Tamana SK, Tun HM, Konya T, Chari RS, Field CJ, Guttman DS, et al. Bacteroides-dominant gut microbiome of late infancy is associated with enhanced neurodevelopment. *Gut Microbes.* 2021;13(1):1–17.

Tan S, Wang Y, Chen K, Long Z, Zou J. Ketamine alleviates depressive-like behaviors via down-regulating inflammatory cytokines induced by chronic restraint stress in mice. *Biol Pharm Bull.* 2017;40(8):1260–7.

Taylor SE. Mechanisms linking early life stress to adult health outcomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(19):8507–12.

Thomas CM, Versalovic J. Probiotic-host communication: Modulation of Host Signaling Pathways. *Gut Microbes.* 2010;1(3):148–63.

Tractenberg SG, Levandowski ML, de Azeredo LA, Orso R, Roithmann LG, Hoffmann ES, et al. An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2016;68:489–503.

Tyrka AR, Ph D, Wier L, Price LH, Ross N, Anderson GM, et al. Childhood parental loss and adult hypothalamic-pituitary- adrenal function. *Biol Psychiatry.* 2009;63(12):1147–54.

Vallerand IA, Patten SB, Barnabe C. Depression and the risk of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2019;31(3):279–84.

Van de Wouw M, Boehme M, Lyte JM, Wiley N, Strain C, O’Sullivan O, et al. Short-chain fatty acids: microbial metabolites that alleviate stress-induced brain–gut axis alterations. *J Physiol.* 2018;596(20):4923–44.

Van den Bergh BRH, van den Heuvel MI, Lahti M, Braeken M, de Rooij SR, Entringer S, et al. Prenatal developmental origins of behavior and mental health: The influence of maternal stress in pregnancy. *Neurosci Biobehav Rev.* 2020 Oct;117:26–64.

Venkoba Rao A. Depressive disorder. Vol. 38, *Social Science and Medicine.* 1994.

Volz HP, Bartečků E, Bartova L, Bessa J, De Berardis D, Dragasek J, et al. Sick leave duration as a potential marker of functionality and disease severity in depression. *Int J Psychiatry Clin Pract.* 2022;0(0):1–11.

Wang G, An T, Lei C, Zhu X, Yang L, Zhang L, et al. Antidepressant-like effect of ginsenoside

Rb1 on potentiating synaptic plasticity via the miR-134-mediated BDNF signaling pathway in a mouse model of chronic stress-induced depression. *J Ginseng Res.* 2022;46(3):376–86.

Wang L, Deng B, Yan P, Wu H, Li C, Zhu H, et al. Neuroprotective effect of ketamine against TNF- α -induced necroptosis in hippocampal neurons. *J Cell Mol Med.* 2021;25(7):3449–59.

Wang S, Sun Q, Zhai L, Bai Y, Wei W, Jia L. The prevalence of depression and anxiety symptoms among overweight/obese and non-overweight/non-obese children/adolescents in China: A systematic review and meta-analysis. *Int J Environ Res Public Health.* 2019;16(3).

Waters RC, Gould E. Early Life Adversity and Neuropsychiatric Disease: Differential Outcomes and Translational Relevance of Rodent Models. *Front Syst Neurosci.* 2022;16(June).

Watson KT, Simard JF, Henderson VW, Nutkiewicz L, Lamers F, Nasca C, et al. Incident Major Depressive Disorder Predicted by Three Measures of Insulin Resistance: A Dutch Cohort Study. *Am J Psychiatry.* 2021;178(10):914–20.

Waugh J, Goa KL. Escitalopram: A review of its use in the management of major depressive and anxiety disorders. *CNS Drugs.* 2003;17(5):343–62.

Wei Y, Chang L, Hashimoto K. A historical review of antidepressant effects of ketamine and its enantiomers. *Pharmacol Biochem Behav.* 2020;190(January).

World health organization Depression and other common mental disorders: global health estimates. World Health Organization, 2017.

World health organization. Depression Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>. Acesso em: 10 abril 2022.

World health organization. Depression. Disponível em: WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf Acesso em: 15 de outubro de 2021.

Woelfer M, Kasties V, Kahlfuss S, Walter M. The Role of Depressive Subtypes within the Neuroinflammation Hypothesis of Major Depressive Disorder. *Neuroscience.* 2019;403:93–110.

Woelfer M, Li M, Colic L, Liebe T, Di X, Biswal B, et al. Ketamine-induced changes in plasma brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels are associated with the resting-state functional connectivity of the prefrontal cortex. *World J Biol Psychiatry.* 2020;21(9):696–710.

Xie R, Jiang P, Lin L, Jiang J, Yu B, Rao J, et al. Oral treatment with *Lactobacillus reuteri* attenuates depressive-like behaviors and serotonin metabolism alterations induced by chronic social defeat stress. *J Psychiatr Res [Internet].* 2020;122(September 2019):70–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2019.12.013>

Xu M, Tian P, Zhu H, Zou R, Zhao J, Zhang H, et al. *Lactobacillus paracasei* CCFM1229 and *Lactobacillus rhamnosus* CCFM1228 Alleviated Depression-and Anxiety-Related Symptoms of Chronic Stress-Induced Depression in Mice by Regulating Xanthine Oxidase Activity in the Brain. *Nutrients.* 2022;14(6).

Xu Y, Hackett M, Carter G, Loo C, Gálvez V, Glozier N, et al. Effects of Low-Dose and Very Low-Dose Ketamine among Patients with Major Depression: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2016;19(4):1–15.

Yang Y, Zhao S, Yang X, Li W, Si J, Yang X. The antidepressant potential of *Lactobacillus casei* in the postpartum depression rat model mediated by the microbiota-gut-brain axis. *Neurosci Lett*. 2022;774(August 2021):136474.

Zhao F, Wang K, Wen Y, Chen X, Liu H, Qi F, et al. Contribution of hippocampal BDNF/CREB signaling pathway and gut microbiota to emotional behavior impairment induced by chronic unpredictable mild stress during pregnancy in rats offspring.

Zhong H, Haddjeri N, Sánchez C. Escitalopram, an antidepressant with an allosteric effect at the serotonin transporter—a review of current understanding of its mechanism of action. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012;219(1):1–13.

ANEXO I - CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **21/05/2019**.

Título do projeto	Investigação do eixo intestino-microbiota-cérebro no desenvolvimento do comportamento depressivo induzido pelo estresse no início da vida.
Project title	Gut-inflammation-brain axis underlying the early life stress-induced development programming of depressive behavior
Número do protocolo Protocol number	032/2019-1
Pesquisador principal Principal Investigator	Gislaine Zilli Réus
Pesquisadores Researchers	João Paulo Behenck, Laura de Araujo Borba, Camilla Marques Luz, Ritele Hernandez Silva, Airam Barbosa de Moura, Anelise Scussel Carlessi, Beatriz da Costa Chede, Raissa Walter de Freitas.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/06/2019 a 01/06/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico/Wistar
Idade/Peso	1 a 61 dias /50-350g
Número de animais / Gênero	435 / Masculino e 435 / Feminino = 870
Origem	Biotério Unesc

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes.

May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Samira S. Valvassori
Samira da Silva Valvassori
 Coordenadora do CEUA

Criciúma, 21 de maio de 2019