

EFEITO DO TIPO ANSIOLÍTICO DE *Limosilactobacillus reuteri* como PÓS-BIÓTICO ENRIQUECIDO COM SELÊNIO EM MODELO PRÉ-CLÍNICO

ALINE SILVEIRA GONÇALVES¹; MARIANA PARROM PAIM¹; ANA VITÓRIA COSTA²; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE²; PALOMA TABORDA BIRMANN³; CÉSAR AUGUSTO BRÜNING¹

¹Laboratório de Bioquímica e Neurofarmacologia Molecular (LABIONEM), Universidade Federal de Pelotas – nutrialinesilgon@gmail.com; cabruning@yahoo.com.br.

²Laboratório de Microbiologia - Universidade Federal de Pelotas

³Faculdade Anhanguera Pelotas - paloma_birmann@hotmail.com

1. DESCRIÇÃO DA INOVAÇÃO

Pós-bióticos são compostos derivados de células probióticas inativadas, como fragmentos celulares e metabólitos, que podem impactar positivamente a saúde do hospedeiro quando consumidos em quantidades adequadas. Esses compostos mostram que metabólitos e/ou bactérias não viáveis podem exercer efeitos terapêuticos para a saúde do indivíduo. Nos últimos anos, o uso de pós-bióticos e compostos bioativos tem ganhado destaque como alternativas promissoras para melhorar a saúde mental. Diante disso, a inovação proposta neste trabalho reside no desenvolvimento de um tratamento pós-biótico enriquecido com selênio, capaz de promover benefícios à saúde mental e ao equilíbrio redox do organismo. A combinação de pós-bióticos, derivados de células probióticas inativadas, com uma forma de selênio bioativa representa um avanço no campo da nutrição funcional e terapias para transtornos de ansiedade. Ao utilizar o selenito de sódio, uma forma de selênio mais facilmente absorvível e com menor toxicidade, o tratamento potencializa os efeitos dos compostos pós-bióticos na modulação de comportamentos relacionados à ansiedade.

Nossos resultados, tanto *in vivo* quanto *ex vivo*, estão ilustrados na Figura 1. Os gráficos 1A e 1B mostram os parâmetros avaliados no teste de labirinto em cruz elevado, onde se observa que o grupo tratado com o pós-biótico contendo selênio demonstrou redução significativa no comportamento do tipo ansioso, com os animais deste grupo entrando mais vezes nos braços abertos do aparato e permanecendo mais tempo nos mesmos, em comparação ao grupo veículo. Os gráficos 1C e 1D mostram os resultados da peroxidação lipídica, evidenciando que no hipocampo e no córtex pré-frontal dos animais, os três grupos que receberam *L. reuteri* reduziram significativamente ($p < 0,05$) a peroxidação lipídica em relação ao grupo veículo, sendo que o grupo com selênio, no hipocampo, apresentou resultados mais expressivos.

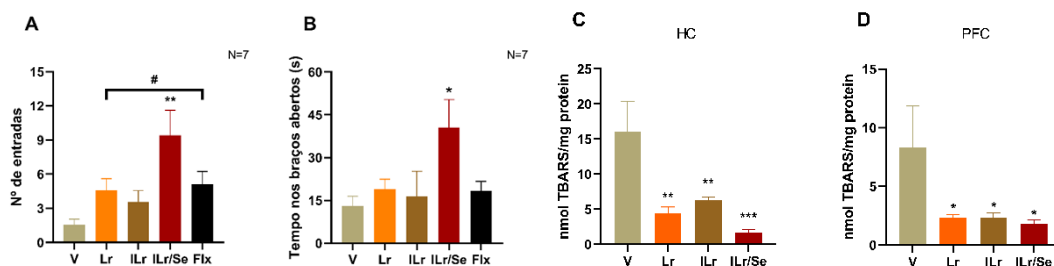


Figura 1 – Efeito ansiolítico e nível de peroxidação lipídica. A – Número de entradas nos braços abertos no teste de labirinto em cruz elevado; B – Tempo total de permanência nos braços abertos no teste de labirinto em cruz elevado; C e D – nmol de TBARS por miligrama de proteína no hipocampo e córtex pré-frontal, respectivamente. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ e (***) $p < 0.001$ quando comparado ao grupo veículo e (#) $p < 0.05$ quando comparado aos outros tratamentos.

2. ANÁLISE DE MERCADO

O transtorno de ansiedade afeta milhões de pessoas em todo o mundo, e em 2022 a revisão da Organização Mundial da Saúde (OMS) revelou que aproximadamente 970 milhões de pessoas sofrem de alguma desordem mental, com 31% apresentando transtornos de ansiedade. A pandemia de COVID-19 exacerbou essa situação, resultando em um aumento de 26% nos casos de transtornos de ansiedade em 2020 (WHO, 2022). O transtorno de ansiedade pode afetar pessoas de todas as idades, mas é especialmente prevalente entre adultos jovens e de meia-idade. Aqueles que buscam tratamentos alternativos geralmente têm entre 18 e 65 anos, com uma maior incidência entre mulheres. Além disso, há uma demanda crescente por tratamentos naturais e não farmacológicos, impulsionada pela insatisfação com as opções tradicionais, como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRSs). Esses medicamentos podem causar efeitos adversos significativos e demoram de 2 a 4 semanas para apresentar resultados (Szuhany, 2022). Assim, os desafios no tratamento deste transtorno têm um alto custo para os órgãos públicos, o mercado global de saúde mental é estimado em cerca de US\$ 380 bilhões, abrangendo todos os tipos de tratamentos e produtos voltados para a saúde mental (Patel, 2018).

Considerando a necessidade de soluções de tratamento sem efeitos adversos severos, a busca por produtos que ofereçam benefícios rápidos e eficazes e o interesse em produtos naturais que promovam um estilo de vida saudável, nossa proposta se destaca. A proposta apresenta ser uma intervenção terapêutica que pode modular os sintomas da ansiedade sem efeitos adversos severos, oferecendo uma alternativa inovadora que atende às necessidades específicas de consumidores insatisfeitos com as opções convencionais.

3. ESTRATÉGIA DE DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO

3.1 Modelo de Negócios

O tratamento com o pós-biótico será posicionado como um produto de alta qualidade, com preços que refletem seu valor inovador e os benefícios terapêuticos que oferece. Poderá ser disponibilizado em farmácias e drogarias, destacando sua proposta de valor como uma alternativa natural e eficaz para o tratamento da ansiedade. Também poderá ser comercializado em lojas que focam em produtos naturais e funcionais, aproveitando seu público-alvo. Estabelecer parcerias com profissionais da saúde que podem recomendar o produto a seus pacientes é uma estratégia interessante. Isso inclui a criação de materiais informativos e workshops que expliquem os benefícios da inovação. Cabe destacar que a inovação irá possuir propriedade intelectual registrada após a finalização de todos os testes pré-clínicos.

O mercado de tratamentos para saúde mental é altamente competitivo, com várias opções farmacêuticas e produtos naturais. Existe o risco de competidores lançarem produtos semelhantes ou de produtos farmacêuticos com marca consolidada oferecerem pressão de preço. Este problema pode ser contornado através de posicionar o produto como uma inovação única, enfatizando a ausência

de efeitos adversos graves e os benefícios terapêuticos rápidos, além de estabelecer parcerias com psicólogos, psiquiatras e nutricionistas para recomendar o produto como parte de um plano de tratamento natural, aumentando a credibilidade e o alcance da inovação.

3.2. Etapas de Desenvolvimento

Este estudo está em TRL 4 (*Technology Readiness Level 4*), que é um dos níveis da escala de maturidade tecnológica, que indica que a tecnologia está em fase de validação do conceito em ambiente laboratorial.

Para avaliação do seu potencial de proteção contra o comportamento do tipo ansioso em camundongos, o isolado bacteriano de *L. reuteri* foi cultivada em meio Man Rogosa e Sharpe (MRS), específico para este gênero. A cultura foi expandida e mantida em agitador orbital a 37°C até alcançar uma concentração de 10⁹ unidades formadoras de colônia por ml (UFC/ml). Em seguida, foi adicionado 0,05 g de selenito de sódio PA por ml de cultura, e a mistura foi incubada novamente em agitador a 37 °C por 24 horas, conforme descrito em estudos anteriores (Xu, 2018; Song, 2022). Para a inativação térmica da cultura, foi utilizado banho-maria a 80 °C por 40 minutos, e armazenado em geladeira a 4°C, para administração posterior.

O experimento foi realizado em camundongos *Swiss* machos, com peso entre 23 e 28 g. Os animais foram distribuídos em cinco grupos: o grupo Veículo (V), que recebeu 300 µl de MRS; o grupo *L. reuteri* (Lr), que recebeu 300 µl de probiótico (10⁹ UFC/ml); o grupo *L. reuteri* inativo (ILr), que recebeu 300 µL de pós-biótico (10⁹ UFC/ml); o grupo *L. reuteri* inativo com selênio (ILr/Se), que recebeu 300 µL de pós-biótico com selênio (10⁹ UFC/ml); e o grupo controle positivo (Flx), tratado com fluoxetina na dose de 5 mg/kg de peso corporal. Os tratamentos foram administrados através de gavagem oral, uma vez ao dia, por 14 dias. Após o período de tratamento foi aplicado o teste de labirinto em cruz elevado, onde o aparato utilizado é um labirinto de madeira em formato de cruz, com dois braços abertos, dois braços fechados e um ponto central. Os parâmetros avaliados foram o número de entradas nos braços abertos e o tempo de permanência nos mesmos. Um aumento nesses parâmetros demonstra um efeito ansiolítico (File and Pellow, 1985). Após, foi realizada a eutanásia e coleta de hipocampo e córtex pré-frontal para análises de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês, "*Thiobarbituric acid reactive substances*" - TBARS).

4. RESULTADOS ESPERADOS E IMPACTO

O desenvolvimento do tratamento com pós-biótico enriquecido com selênio visa não apenas preencher uma lacuna no tratamento de transtornos de ansiedade, mas também gerar impacto positivo tanto na saúde dos indivíduos quanto no mercado de saúde mental. O principal resultado esperado é a demonstração da eficácia do tratamento na prevenção do comportamento tipo ansioso em testes pré-clínicos. Outro resultado importante é a melhoria no equilíbrio redox do organismo, com o selênio bioativo atuando como um agente antioxidante e protetor contra o estresse oxidativo, especialmente no cérebro. Isso não apenas ajudará a reduzir os sintomas de ansiedade, mas também terá um impacto positivo na saúde cerebral a longo prazo, promovendo a neuroproteção e a saúde geral.

Futuramente, devido ao perfil mais natural do produto e à ausência de efeitos adversos significativos, espera-se uma alta aceitação por parte dos pacientes que buscam alternativas naturais aos tratamentos farmacêuticos tradicionais. A adesão ao tratamento tende a ser maior, especialmente em comparação com medicamentos que causam efeitos adversos nas primeiras semanas de uso. Além

do mais, o pós-biótico com selênio será percebido como uma inovação única no segmento de saúde mental e nutrição funcional. Espera-se que o produto conquiste uma posição diferenciada no mercado, atraindo consumidores que buscam tratamentos mais naturais, eficazes e com benefícios adicionais para a saúde.

5. CONCLUSÕES

Essa abordagem inovadora visa oferecer uma proposta promissora de intervenção terapêutica para o transtorno de ansiedade, utilizando mecanismos naturais e de alta biodisponibilidade, além de oferecer uma solução diferenciada e com benefícios amplos para os pacientes e o mercado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FILE SE.; PELLOW S. The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the holeboard. **Br J Pharmacol**. 86(3):729-35, 1985.

MA X.; SHIN JW. IL-6 expression-suppressing *Lactobacillus reuteri* strains alleviate gut microbiota-induced anxiety and depression in mice. **Lett Appl Microbiol**, 77(1), 2024.

PATEL V.; SAXENA, S. The Lancet Commission on global mental health and sustainable development. **Lancet**. 392(10157):1553-1598, 2018.

QIAO L.; CHEN Y. Selenium Nanoparticles-Enriched *Lactobacillus casei* ATCC 393 Prevents Cognitive Dysfunction in Mice Through Modulating Microbiota-Gut-Brain Axis. **Int J Nanomedicine**, New Zealand, 17:4807-4827, 2022.

SABAHI S.; HOMAYOUNI RAD A. Postbiotics as the new frontier in food and pharmaceutical research. **Crit Rev Food Sci Nutr**, 63(26):8375-8402, 2023.

SZUHANY KL.; SIMON, NM. Anxiety Disorders: A Review. **JAMA**. 328(24):2431-2445, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World mental health report: transforming mental health mental**. 2022

MAEHATA H.; KOBAYASHI Y. Heat-killed *Lactobacillus helveticus* strain MCC1848 confers resilience to anxiety or depression-like symptoms caused by subchronic social defeat stress in mice. **Biosci Biotechnol Biochem**, 83(7):1239-1247, 2019.

CHEN X.; LIU Y. Inactivation of *Lactobacillus* Virulent Bacteriophage by Thermal and Chemical Treatments. **J Food Prot**, 81(10):1673-1678, 2018.

XIAO D.; LI T. Advances in the Study of Selenium-Enriched Probiotics: From the Inorganic Se into Se Nanoparticles. **Mol Nutr Food Res**, 67(23), 2023.

BANDELOW B.; ALLGULANDER C. World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) guidelines for treatment of anxiety, obsessive-compulsive and posttraumatic stress disorders - Version 3. Part I: Anxiety disorders. **World J Biol Psychiatry**, 24(2):79-117, 2023.

KAMBE J.; WATCHARIN S. Heat-killed *Enterococcus faecalis* (EC-12) supplement alters the expression of neurotransmitter receptor genes in the prefrontal cortex and alleviates anxiety-like behavior in mice. **Neurosci Lett**, 720:134753, 2020.

HAARHUIS J.E.; KARDINAAL A. Probiotics, prebiotics and postbiotics for better sleep quality: a narrative review. **Benef Microbes**, 13(3):169-182, 2022.