



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Bruna Rodrigues Rentes

Probióticos de Nova Geração Produtores de BH4: uma abordagem inovadora no tratamento da depressão inflamatória

Florianópolis

2025

Bruna Rodrigues Rentes

Probióticos de Nova Geração Produtores de BH4: uma abordagem inovadora no tratamento da depressão inflamatória

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Agronomia.

Orientadora: Profa. Dra. Shirley Kuhnen

Coorientadora: Dra. Sylvie Vancassel

Florianópolis

2025

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste estágio marca o fim da minha trajetória acadêmica em Agronomia, com especialização em Ciências dos Alimentos, Nutrição e Saúde. Representa também o encerramento do meu duplo diploma, viabilizado pela parceria entre a Universidade Federal de Santa Catarina, no Brasil, e a Bordeaux Sciences Agro, na França. Agradeço à CAPES e ao programa BRAFRAGRI pela bolsa de mobilidade, que me permitiu ampliar meus horizontes tanto acadêmicos quanto pessoais.

Tive a oportunidade de realizar meu estágio no laboratório NutriNeuro, na equipe NutriPsy, em um projeto fascinante sobre as relações entre o microbiota intestinal e os transtornos do humor, especialmente a ansiedade e a depressão. Esse estágio ampliou minha paixão pela pesquisa e consolidou meu interesse pelas áreas da microbiota, neurociência e saúde mental.

Sou profundamente grata à minha co-orientadora, Dra. Sylvie Vancassel, por sua constante disponibilidade, gentileza e apoio ao longo desses seis meses. Agradeço também à Dra. Anne-Laure Dinel, por me acolher no laboratório, e a Céline Lucas, cuja ajuda foi essencial em todas as etapas do trabalho. Um agradecimento especial a Anaïs Arrivé e Clara Chéron, pela parceria diária, e a toda a equipe do NutriNeuro, pelo acolhimento e espírito colaborativo.

Quero ainda agradecer a três pessoas que marcaram profundamente minha formação científica: à Dra. Shirley Kuhnen, por me acompanhar durante três anos no LABINAT e me transmitir grande parte das técnicas que aplico hoje, e pela orientação no presente trabalho; à Rayanne Ribeiro, amiga e colega inseparável, que compartilhou comigo aprendizados, erros e conquistas; e a Mohamed Mokrani, que me introduziu à biologia molecular e ao estudo da microbiota humana, e que se tornou um verdadeiro amigo.

Por fim, agradeço à minha família e aos meus amigos pelo apoio incondicional ao longo desses sete anos de estudos

A todos e todas, muito obrigada.

*"A depressão é como uma névoa densa
que abafa os sons da alegria e cega os
olhos para as cores da vida."*

— *Sylvia Plath*

RESUMO

A obesidade induzida por dieta rica em gorduras (HF) está associada a distúrbios de humor mediados por processos inflamatórios e alterações na neurotransmissão. A tetrahydrobiopterina (BH4), cofator essencial na síntese de monoaminas, pode ter um papel central nessa relação. Neste estudo, avaliamos duas cepas bacterianas produtoras de BH4 em camundongos machos C57BL/6J submetidos a uma dieta HF. A cepa B2 (10^9 UFC/200 μ L) reduziu a massa gorda, restaurou a composição corporal, normalizou a preferência por sacarose e melhorou o aspecto da pelagem, enquanto a cepa B1 (10^8 UFC/200 μ L) apresentou efeitos mais limitados. No plano bioquímico, a B2 aumentou o pool colônico de pteridinas e, juntamente com B1, restaurou os níveis estriatais de noradrenalina, sem alterar significativamente os níveis globais de dopamina e serotonina. Além disso, observou-se redução do tempo de imobilidade no último minuto do teste de nado forçado no grupo tratado com B2 em comparação ao grupo HF, sugerindo um efeito positivo sobre o comportamento depressivo. Esses resultados indicam que bactérias produtoras de BH4 podem modular simultaneamente o metabolismo, a neurotransmissão e o comportamento, apontando para novas abordagens probióticas na depressão associada à inflamação.

Palavras-chave: Depressão inflamatória; Psicobióticos; Tetrahydrobiopterina.

ABSTRACT

Obesity induced by a high-fat (HF) diet is associated with mood disorders mediated by inflammatory processes and alterations in neurotransmission. Tetrahydrobiopterin (BH4), an essential cofactor in monoamine synthesis, may play a central role in this relationship. In this study, we evaluated two BH4-producing bacterial strains in male C57BL/6J mice fed an HF diet. Strain B2 (10^9 CFU/200 μ L) reduced fat mass, restored body composition, normalized sucrose preference, and improved coat condition, while strain B1 (10^8 CFU/200 μ L) showed more limited effects. At the biochemical level, B2 increased the colonic pteridine pool and, together with B1, restored striatal norepinephrine levels without significantly affecting overall dopamine or serotonin levels. Moreover, a reduction in immobility time during the last minute of the forced swim test was observed in the B2-treated group compared to the HF group, suggesting a beneficial effect on depressive-like behavior. These findings indicate that BH4-producing bacteria can simultaneously modulate metabolism, neurotransmission, and behavior, highlighting their potential as a novel probiotic approach for inflammation-associated depression.

Keywords: Inflammatory depression; Psychobiotics; Tetrahydrobiopterin

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT: 5-Hidroxitriptamina (Serotonina)

AGCC: Ácidos Graxos de Cadeia Curta

AVC: Acidente Vascular Cerebral

B1 / B2: Cepas Bacterianas Produtoras de BH4

BAT: Tecido Adiposo Marrom (Brown Adipose Tissue)

BH2: Dihidrobiopterina

BH4: Tetraidrobiopterina

BHE: Barreira Hematoencefálica

C: Grupo Controle

CNRS: Centro Nacional de Pesquisa Científica

CR: Carbonila Redutase

CRP: Proteína C-Reativa

DA: Dopamina

DHFR: Dihidrofolato Redutase

DHPR: Dihidropteridina Redutase

DSM: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

DTT: Ditiotreitól

EDC: Episódio Depressivo Caracterizado

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EHIS: Pesquisa Europeia sobre Saúde (European Health Interview Survey)

EPM: Labirinto em Cruz Elevado (Elevated Plus Maze)

FST: Teste de Nado Forçado (Forced Swim Test)

GCH1 / GTP-CH1: GTP-Ciclohidrolase 1

GTP: Guanosina Trifosfato

HAM-D: Escala de Depressão de Hamilton (Hamilton Depression Rating Scale)

HF: Grupo Dieta Rica em Gorduras

HF-B1 / HF-B2: Grupo Dieta Rica em Gorduras + Ceba B1 ou B2

HFD: Dieta Rica em Gorduras (High-Fat Diet)

HPLC-ECD: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Eletroquímica (High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection)

HPLC-MS: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massa (High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry)

IDO: Indoleamina-2,3-Dioxigenase

IL-1 β : Interleucina-1 Beta

IL-6: Interleucina-6

IMAO: Inibidores da Monoamina Oxidase

INRAE: Instituto Nacional de Pesquisa para a Agricultura, Alimentação e Meio Ambiente

ISRN: Inibidores Seletivos da Recaptação de Noradrenalina

ISRS: Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina

LPS: Lipopolissacarídeos

MMN: Negatividade de Incongruência (Mismatch Negativity)

NA: Noradrenalina

NGP: Probióticos de Nova Geração (Next Generation Probiotics)

NO: Óxido Nítrico (Nitric Oxide)

NOS: Óxido Nítrico Sintase (Nitric Oxide Synthase)

NutriNeuro: Unidade de Pesquisa em Nutrição e Neurobiologia Integrada

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: Solução Salina Tamponada com Fosfato (Phosphate-Buffered Saline)

PCD: Pteridina-4a-Carbinolamina Desidratase

PTPS: 6-Piruvil-Tetraidropterina Sintase

qBH2: Dihidrobiopterina Quinonoide

qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (Quantitative Polymerase Chain Reaction)

RNS: Espécies Reativas de Nitrogênio (Reactive Nitrogen Species)

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio (Reactive Oxygen Species)

RP: Proteína C-Reativa (C-reactive protein) (repetido acima como CRP – manter apenas um, se desejar)

SR: Sepiapterina Redutase

SPT: Teste de Preferência por Sacarose (Sucrose Preference Test)

TD-NMR: Ressonância Magnética Nuclear no Domínio do Tempo (Time-Domain Nuclear Magnetic Resonance)

TH: Tirosina Hidroxilase

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa (Tumor Necrosis Factor Alpha)

TPH: Triptofano Hidroxilase

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 DEPRESSÃO: CARACTERIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA	13
2.2 A TEORIA DAS MONOAMINAS E OS TRATAMENTOS ATUAIS	14
2.3 OBESIDADE E DEPRESSÃO: A INFLAMAÇÃO COMO FATOR COMUM	16
2.4 TETRAHIDROBIOPTERINA (BH4): METABOLISMO E PAPEL FISIOLÓGICO	18
2.5 ESTRESSE OXIDATIVO E REGULAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DE BH4	20
2.6 EVIDÊNCIAS CLÍNICAS E PRÉ-CLÍNICAS SOBRE O USO (OU MODULAÇÃO) DA BH4 NO TRATAMENTO DA DEPRESSÃO	21
2.7 O EIXO MICROBIOTA-INTESTINO-CÉREBRO, A DEPRESSÃO E A BH4	22
3 OBJETIVOS	24
4 HIPÓTESES	25
5 MATERIAL E MÉTODOS	25
5.1 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	25
5.2 TRATAMENTOS E PROTOCOLO EXPERIMENTAL	27
5.3 TESTES COMPORTAMENTAIS	29
5.3.1 Teste do Estado da Pelagem (Coat State Test)	29
5.3.2 Splash Test	30
5.3.3 Teste de Preferência por Sacarose (SPT)	31
5.3.4 Teste de Nado Forçado (FST)	32
5.4 EVOLUÇÃO PONDERAL E COMPOSIÇÃO CORPORAL	33
5.5 ANÁLISE DAS MONOAMINAS NOS TECIDOS CEREBRAIS	33
5.5.1. Extração das monoaminas	33
5.5.2. Quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	34
5.5 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE BH4 NO CÓLON E NO PLASMA	34
5.6.1 Extração da tetrahydrobiopterina (BH4) e da dihydrobiopterina (BH2)	34
5.6.2 Quantificação de BH4 e BH2	35
5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	35
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6.1 RESULTADOS	36
6.1.1 Acompanhamento do peso e da composição corporal	36
6.1.2. Avaliação do estado da pelagem (Coat State Test – CS)	39
6.1.3 Splash Test	40
6.1.4 Teste de Preferência pela Sucrose	41
6.1.5 Teste de Natação Forçada (Forced Swim Test - FST)	42
6.1.6 Análise da concentração de BH4 e BH2 no cólon e no plasma	43
6.1.7 Análise das monoaminas nos tecidos cerebrais	44
6.1.7.1 Hipocampo	44
6.1.7.2 Córtex pré-frontal	45
6.1.8.3 Estriado	46
6.2 DISCUSSÃO	46
6.2.1 Peso e composição corporal	47

6.2.2 Testes comportamentais	47
6.2.3 Metabolismo periférico das pterinas	50
6.2.4 Monoaminas centrais	51
7 CONCLUSÕES	52

1 INTRODUÇÃO

A depressão constitui atualmente um dos transtornos psiquiátricos mais prevalentes e incapacitantes em escala mundial. Estima-se que a doença afete cerca de 280 milhões de pessoas, representando não apenas um problema de saúde pública, mas também um fardo econômico e social expressivo. Apesar dos avanços nos tratamentos farmacológicos baseados na hipótese monoaminérgica, uma proporção significativa de pacientes permanece refratária às abordagens convencionais, o que sugere a existência de mecanismos fisiopatológicos mais complexos. Entre esses mecanismos, a inflamação crônica de baixo grau, frequentemente associada à obesidade e a distúrbios metabólicos, tem emergido como um fator chave na vulnerabilidade à depressão. Esse processo inflamatório crônico interfere na neurotransmissão, na plasticidade neuronal e no metabolismo de cofatores enzimáticos essenciais, como a tetrahydrobiopterina (BH4), criando um contexto propício às alterações do humor.

Nesse cenário, o eixo intestino-cérebro e o papel da microbiota intestinal têm despertado interesse científico crescente. Estudos recentes indicam que a disbiose e o aumento da permeabilidade intestinal favorecem a translocação de mediadores inflamatórios, os quais, por sua vez, modulam a neurotransmissão monoaminérgica e intensificam os sintomas depressivos. Paralelamente, algumas bactérias intestinais parecem capazes de influenciar diretamente a disponibilidade de BH4, abrindo caminho para abordagens terapêuticas inovadoras baseadas na modulação da microbiota. A investigação de cepas bacterianas produtoras de BH4 em um modelo murino de depressão induzida por uma dieta hiperlipídica insere-se, portanto, nessa perspectiva de pesquisa translacional voltada à identificação de novas estratégias contra formas resistentes de depressão.

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório NutriNeuro (INRAE, Bordeaux, França), uma unidade mista de pesquisa especializada no estudo das interações entre nutrição, metabolismo e cérebro. Ao integrar as áreas de neurociência, nutrição e imunologia, o NutriNeuro adota uma abordagem original voltada à compreensão dos mecanismos biológicos que conectam alimentação e saúde mental, além de propor novas perspectivas terapêuticas. O projeto apresentado também se insere no âmbito de um programa de pré-maturação conduzido pela

Universidade de Bordeaux, cujo objetivo é aprofundar a compreensão dos efeitos do uso de determinados probióticos de nova geração (NGP) no contexto da depressão inflamatória. Essa etapa exploratória busca abrir caminho para desenvolvimentos em maior escala, visando consolidar as evidências científicas e, futuramente, favorecer a aplicação dos resultados para aplicações clínicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DEPRESSÃO: CARACTERIZAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

O transtorno depressivo, também denominado episódio depressivo maior (EDM), é uma condição mental comum na população geral (OMS, 2023). De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5, *American Psychiatric Association*, 2013), o diagnóstico requer a presença de pelo menos cinco sintomas, dentre uma lista predefinida, durante um período mínimo de duas semanas, representando uma ruptura em relação ao funcionamento habitual do indivíduo. Um dos sintomas deve obrigatoriamente consistir em humor deprimido ou perda acentuada de interesse ou prazer. Entre as manifestações mais frequentes estão alterações do sono, do apetite ou do peso corporal, fadiga, dificuldade de concentração, agitação ou lentidão psicomotora, sentimentos de culpa ou de desvalorização e pensamentos recorrentes de morte.

Segundo o *Institute for Health Metrics and Evaluation* (2021), a depressão afeta aproximadamente 3,8% da população mundial, incluindo 5% dos adultos (4% dos homens e 6% das mulheres) e 5,7% das pessoas com mais de 60 anos. Estima-se que cerca de 280 milhões de indivíduos no mundo sofram de depressão. Apesar dessa alta prevalência global, o cenário é ainda mais preocupante em alguns países. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde (2025), cerca de 15% da população apresenta sintomas compatíveis com depressão, representando a maior prevalência da América Latina. Além disso, dados das Nações Unidas Brasil (2025) indicam que os afastamentos do trabalho por transtornos mentais mais que dobraram entre 2022 e 2024, sendo os episódios depressivos responsáveis por cerca de 26% dos casos de incapacidade temporária.

Os impactos da depressão, portanto, vão muito além do sofrimento individual. A Organização Mundial da Saúde (2022) estima que 12 bilhões de dias de trabalho

sejam perdidos todos os anos devido à depressão e à ansiedade, resultando em uma perda econômica global de aproximadamente um trilhão de dólares.

Essas consequências, tanto no plano individual quanto social, reforçam a importância de estratégias eficazes de manejo e tratamento da depressão. Para compreender a evolução das abordagens terapêuticas desenvolvidas nas últimas décadas, é essencial revisar os principais modelos biológicos que orientaram a pesquisa e o desenvolvimento de fármacos antidepressivos.

2.2 A TEORIA DAS MONOAMINAS E OS TRATAMENTOS ATUAIS

A ideia de que a depressão poderia estar relacionada a um desequilíbrio nos neurotransmissores surgiu na década de 1960, a partir de observações que mostraram que certos antidepressivos, capazes de aumentar a concentração sináptica de serotonina, noradrenalina e dopamina, promoviam melhora nos sintomas depressivos (Delgado, 2000; Hirschfeld, 2000). Essa constatação levou à formulação da chamada “hipótese das monoaminas”, que rapidamente passou a ocupar uma posição central na pesquisa e na prática psiquiátrica. Durante várias décadas, essa hipótese orientou o desenvolvimento dos principais antidepressivos, desde os inibidores da monoamina oxidase (IMAO) e os antidepressivos tricíclicos até os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) e de noradrenalina (ISRN) (Belmaker e Agam, 2008).

No entanto, esse modelo apresentou limitações logo em seus primeiros anos. Observou-se, por exemplo, uma diferença entre o aumento rápido das concentrações de monoaminas após a administração de antidepressivos e o atraso, muitas vezes de várias semanas, até a manifestação da melhora clínica. Para explicar essa diferença, pesquisadores sugeriram que processos adaptativos, como a regulação dos receptores pós-sinápticos e alterações na sinalização intracelular, estariam envolvidos (Hirschfeld, 2000). Além disso, uma abordagem estritamente monoaminérgica não explica por que alguns pacientes não respondem aos antidepressivos tradicionais, nem por que determinadas moléculas com baixa ação sobre as monoaminas podem ainda assim exercer efeito terapêutico (Delgado, 2000; Belmaker e Agam, 2008).

A partir dos anos 2000, novas hipóteses foram propostas para complementar e refinar esse modelo, destacando mecanismos mais complexos, como aqueles

relacionados à neuroplasticidade cerebral, ao papel do estresse crônico e do eixo hipotálamo–hipófise–adrenal, bem como à inflamação e às interações entre o cérebro e o sistema imunológico (Malhi e Mann, 2018). Essas perspectivas mais recentes procuram superar a visão simplificada de um mero “desequilíbrio químico”, contribuindo para uma compreensão mais ampla da variabilidade individual nas respostas terapêuticas, do atraso de ação dos antidepressivos e dos casos de depressão resistente ao tratamento.

Embora a teoria monoaminérgica tenha estruturado por muito tempo a compreensão e o tratamento da depressão, ela enfrenta limitações significativas. Aproximadamente um terço dos pacientes não responde adequadamente aos antidepressivos convencionais, mesmo após várias tentativas com diferentes medicamentos, uma condição conhecida como depressão resistente ao tratamento (Rush *et al.*, 2006). Diversos estudos sugerem que essa falta de resposta está parcialmente associada à presença de processos inflamatórios persistentes (Felger, 2019; Vancassel, Capuron e Castanon, 2018; Miller e Raison, 2016).

Essa constatação levou a um redirecionamento das pesquisas em busca de mecanismos biológicos alternativos envolvidos na depressão, entre os quais a inflamação crônica de baixo grau ocupa posição de destaque. Essa hipótese inflamatória apoia-se em diversas observações biológicas e clínicas, como a elevada prevalência de transtornos depressivos entre pacientes que apresentam doenças inflamatórias crônicas (como diabetes, doenças autoimunes, câncer e obesidade) ou que recebem tratamentos imunoterápicos à base de citocinas (para o tratamento da hepatite e de alguns tipos de câncer, por exemplo).

Neste trabalho, serão abordadas mais especificamente as relações entre a inflamação associada à obesidade e a depressão.

2.3 OBESIDADE E DEPRESSÃO: A INFLAMAÇÃO COMO FATOR COMUM

A obesidade e a depressão são dois importantes problemas de saúde pública, cuja prevalência vem aumentando de forma paralela (Organização Mundial da Saúde, 2025; Chen *et al.*, 2025). A literatura científica destaca uma relação bidirecional entre essas condições: a obesidade aumenta o risco de depressão e, inversamente, a depressão favorece o ganho de peso e o desenvolvimento de distúrbios metabólicos

(Capuron, Lasselín e Castanon, 2017). Essa relação é particularmente evidente em certas formas chamadas de depressão “atípica”, caracterizadas por hipersonia, hiperfagia e fadiga, sintomas mais frequentes em indivíduos com maior adiposidade (Lamers et al., 2012).

Do ponto de vista fisiopatológico, a inflamação sistêmica de baixo grau surge como um mecanismo central que conecta a obesidade à depressão. O tecido adiposo, especialmente o tecido adiposo visceral, secreta citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e proteína C-reativa (CRP), produzidas tanto pelos adipócitos quanto pelas células imunológicas infiltradas. Esses mediadores podem alcançar o cérebro e induzir neuroinflamação, particularmente no hipotálamo e no hipocampo, regiões essenciais para a regulação do humor e da plasticidade neuronal (Dinel et al., 2011; Capuron, Lasselín e Castanon, 2017).

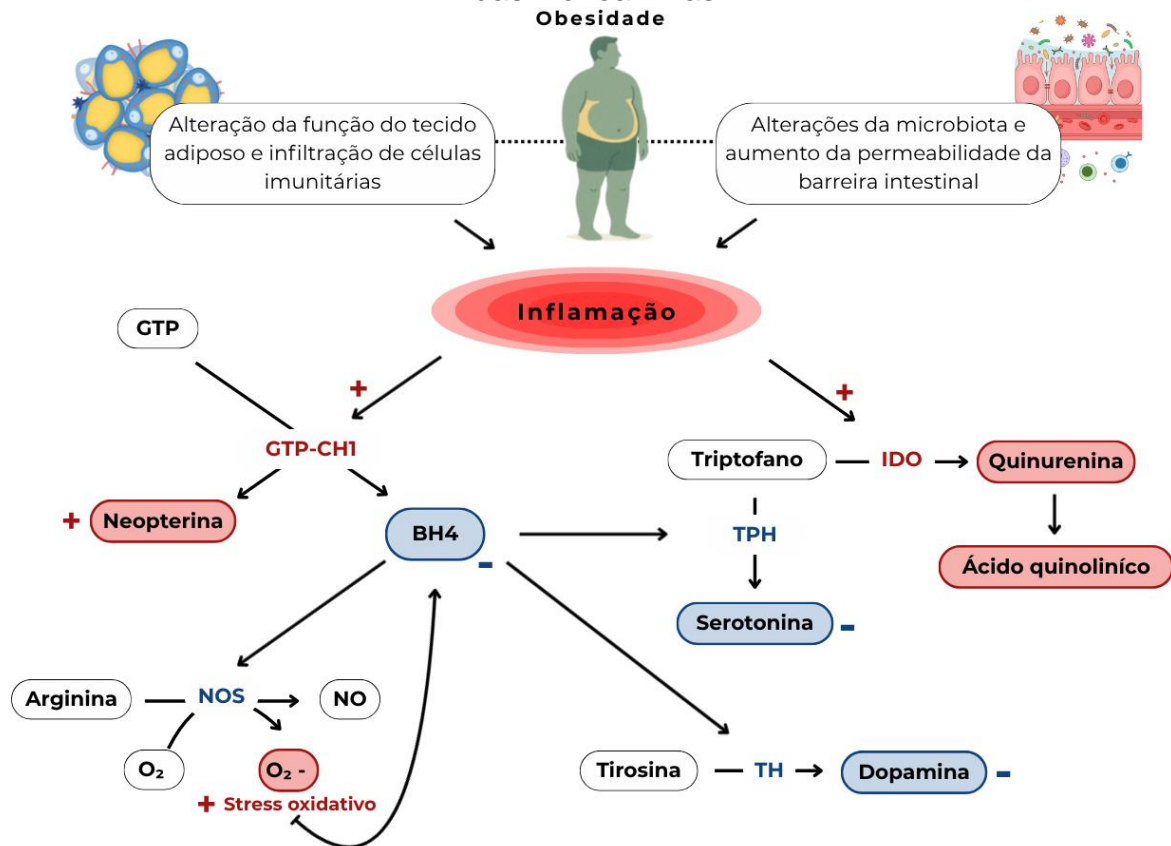
Duas vias metabólicas ilustram bem como a inflamação pode contribuir para o desenvolvimento da depressão. A primeira envolve a ativação da indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), que desvia o triptofano da produção de serotonina para a formação de quinurenina. Essa mudança reduz a disponibilidade de serotonina e estimula a produção de metabólitos como o ácido quinolínico, dotado de propriedades neurotóxicas e pró-inflamatórias (Suneson et al., 2021).

A segunda via diz respeito à tetrahydrobiopterina (BH4), um cofator essencial para a síntese das monoaminas. Em contextos inflamatórios, a produção de BH4 é desviada para uma função pró-oxidante, por meio do aumento da atividade da óxido nítrico sintase (NOS), o que leva à geração de espécies reativas de oxigênio, processo que ocorre em detrimento da produção de serotonina e dopamina (Fanet et al., 2021).

Além desses mecanismos, evidências recentes apontam também para o papel do eixo cérebro–intestino. A inflamação crônica pode estar associada a uma alteração da permeabilidade intestinal e a mudanças na composição da microbiota, o que facilita a passagem de mediadores pró-inflamatórios para a circulação sistêmica e contribui para a sintomatologia depressiva (Capuron, Lasselín e Castanon, 2017).

Essas perturbações, ilustradas na Figura 1, mostram como a inflamação pode simultaneamente comprometer a neurotransmissão monoaminérgica e fragilizar a integridade neuronal (Capuron, Lasselín e Castanon, 2017).

Figura 1 – A inflamação associada à obesidade provoca alterações na biossíntese das monoaminas.



A obesidade está associada a disfunções do tecido adiposo e à infiltração de células imunes, além de modificações no microbiota intestinal e aumento da permeabilidade intestinal. Esses fenômenos promovem um estado de inflamação crônica de baixo grau. Os mediadores inflamatórios ativam a GTP-ciclohidrolase-1 (GTP-CH1), levando a uma produção aumentada de neopterina em detrimento da tetrahydrobiopterina (BH4), cofator essencial para a síntese das monoaminas. A redução da BH4 limita a atividade da tirosina hidroxilase (TH) e da triptofano hidroxilase (TPH), diminuindo a produção de dopamina e serotonina. Ela também compromete a atividade da óxido nítrico sintase (NOS), resultando no aumento das espécies reativas de oxigênio e do estresse oxidativo. Paralelamente, a ativação da indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) desvia o triptofano para a via da quinurenina, em detrimento da serotonina. A quinurenina é então metabolizada em ácido quinolínico pela micrógliia, contribuindo para efeitos neurotóxicos e para a fisiopatologia depressiva (Fonte: autora, adaptado de Capuron, Lasselín e Castanon, 2017).

Os dados clínicos reforçam esse modelo: diversos estudos demonstram que pacientes obesos apresentam níveis elevados de marcadores inflamatórios, os quais se correlacionam com a gravidade dos sintomas depressivos (Capuron et al., 2008). Por outro lado, a perda de peso, obtida por meio de dietas ou de cirurgia bariátrica, está associada à redução da inflamação sistêmica e à melhora do humor (Emery et al., 2007).

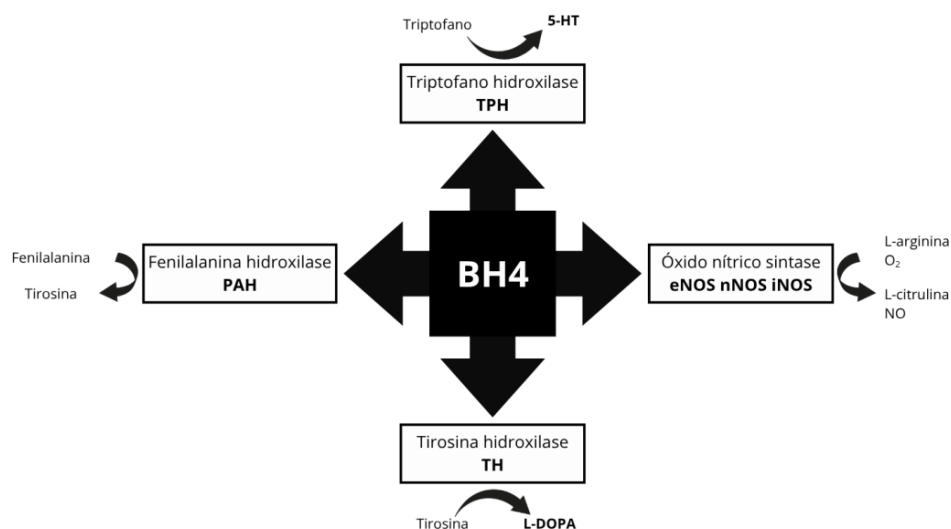
Nesse contexto, o modelo murino de depressão induzida através de uma dieta rica em gorduras (HFD) mostra-se particularmente relevante. Esse modelo reproduz um estado inflamatório sistêmico e cerebral, caracterizado pela ativação da microglia

e pela desregulação das vias da quinurenina e da BH4, o que resulta em alterações nos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico associadas aos sintomas depressivos (Cardinal et al., 2021). Assim, esse modelo constitui uma ferramenta pré-clínica robusta para o estudo dos mecanismos específicos da depressão de origem inflamatória.

2.4 TETRAHIDROBIOPTERINA (BH4): METABOLISMO E PAPEL FISIOLÓGICO

A tetrahydrobiopterina (BH4) é um cofator essencial para o funcionamento adequado de várias enzimas envolvidas na produção de neurotransmissores, como dopamina e serotonina, bem como na síntese de óxido nítrico (NO), como mostra a Figura 2.

Figura 2 – Funções da BH4 como cofator enzimático

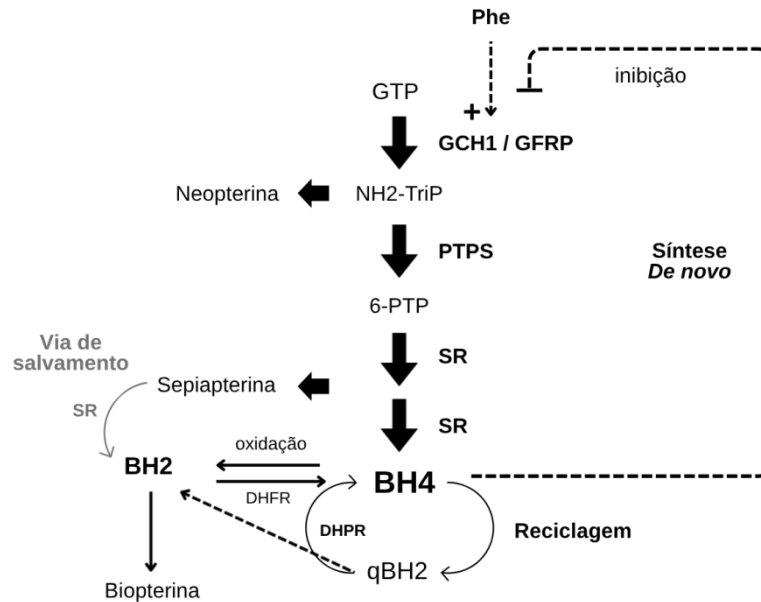


A BH4 atua como cofator das hidroxilases da fenilalanina (PAH), tirosina (TH) e triptofano (TPH), além das isoformas da óxido nítrico sintase (eNOS, nNOS e iNOS). A PAH catalisa a conversão de fenilalanina em tirosina; a TH converte tirosina em L-DOPA, precursor das catecolaminas; e a TPH converte triptofano em 5-hidroxitriptofano (5-HTP), precursor da serotonina (5-HT). Já a óxido nítrico sintase utiliza L-arginina e oxigênio (O₂) para formar L-citrulina e óxido nítrico (NO). Dessa forma, a disponibilidade de BH4 é fundamental para a síntese adequada de monoaminas e de NO (Fonte: autora)

Sua biossíntese ocorre principalmente pela via *de novo*, iniciada a partir do trifosfato de guanosina (GTP) e dependente da ação sequencial das enzimas GTP-ciclohidrolase 1 (GCH1), 6-piruvil-tetrahydrobiopterina sintase (PTPS) e sepiapterina redutase. Além disso, duas outras vias contribuem para manter sua disponibilidade: a via de salvamento, que compensa déficits enzimáticos, e a via de reciclagem, mediada pela dihydropteridina redutase (DHPR) e pela dihydrofolato redutase (DHFR), que

regeneram a BH4 ativa a partir de sua forma oxidada, a BH2 (Fanet et al., 2021). A **Figura 3** ilustra, de forma simplificada, as vias de biossíntese da BH4.

Figura 3 – Vias de biossíntese da BH4.



A BH4 pode ser sintetizada e regenerada por três vias metabólicas complementares. A via de novo começa a partir do GTP e envolve a GTP-ciclohidrolase 1 (GCH1), a 6-piruviltetraidropterina sintase (PTPS) e a sepiapterina redutase (SR). A via de salvamento converte a sepiapterina em BH4 por meio da SR, além de reduzir a BH2 em BH4 pela ação da DHFR. Por fim, a via de reciclagem utiliza a DHPR para restaurar a BH4 a partir de sua forma oxidada (qBH2). A neopterina e a biopterina são produtos de degradação eliminados pelo organismo e não reutilizados na síntese da BH4 (Fonte: autora, adaptado de Fanet et al., 2021).

Em condições fisiológicas, existe um equilíbrio dinâmico entre a produção, utilização e regeneração da BH4. No entanto, esse equilíbrio é vulnerável ao estresse oxidativo e à ativação imunológica, que podem reduzir sua biodisponibilidade e comprometer o funcionamento das enzimas que dependem dela (Capuron et al., 2011).

2.5 ESTRESSE OXIDATIVO E REGULAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DE BH4

A disponibilidade da BH4 é rigidamente controlada pelo equilíbrio entre suas formas reduzida (BH4) e oxidadas (BH2 e qBH2). Em condições fisiológicas, esse equilíbrio dinâmico garante uma atividade ideal das enzimas dependentes de BH4, especialmente das hidroxilases envolvidas na síntese de monoaminas e da óxido nítrico sintase (NOS).

Entretanto, a BH4 é uma molécula altamente sensível ao estresse oxidativo: na presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), ela é rapidamente oxidada em dihidrobiopterina (BH2), uma forma inativa que compete com a BH4 pelos mesmos sítios enzimáticos (Fanet, 2018; Channon, 2020).

Essa oxidação contribui para o fenômeno conhecido como desacoplamento da óxido nítrico sintase (NOS). Em situações de deficiência relativa de BH4, a NOS deixa de produzir óxido nítrico (NO) e passa a gerar ânion superóxido, o que intensifica o estresse oxidativo e a inflamação local (Channon, 2020; Förstermann e Sessa, 2012). Esse ciclo vicioso resulta em uma diminuição da biodisponibilidade de NO, molécula essencial para a vasodilatação, a perfusão cerebral e a plasticidade neuronal, ao mesmo tempo em que aumenta a carga oxidativa celular.

A perturbação desse equilíbrio redox também afeta a neurotransmissão monoaminérgica. A oxidação da BH4 reduz a atividade das enzimas tirosina-hidroxilase e triptofano-hidroxilase, limitando a síntese de dopamina e serotonina (Capuron et al., 2011; Fanet, 2018). Essas alterações bioquímicas são bastante relevantes, já que níveis elevados de estresse oxidativo e inflamação são frequentemente observados em pacientes deprimidos, sugerindo que a regulação da BH4 desempenha um papel central na fisiopatologia da depressão (Miller e Raison, 2016).

Assim, o estresse oxidativo atua não apenas como um fator de depleção de BH4, mas também como um amplificador das disfunções enzimáticas resultantes, criando um ambiente propício à neuroinflamação, à redução da neurotransmissão e, conseqüentemente, ao aparecimento de sintomas depressivos.

2.6 EVIDÊNCIAS CLÍNICAS E PRÉ-CLÍNICAS SOBRE O USO (OU MODULAÇÃO) DA BH4 NO TRATAMENTO DA DEPRESSÃO

Um conjunto ainda limitado, mas crescente, de dados pré-clínicos e clínicos sugere que a modulação da BH4 pode representar uma via terapêutica promissora em determinadas formas de depressão. Um estudo recente demonstrou que a administração de BH4 em camundongos expostos a um desafio inflamatório induzido por lipopolissacarídeo (LPS) foi capaz de restaurar os níveis de dopamina no corpo estriado, normalizar a resposta locomotora e reduzir a expressão de citocinas pró-

inflamatórias (Fanet et al., 2020). Embora o potencial efeito antidepressivo da administração de BH4 em humanos, por exemplo, por meio de suplementação oral, tenha sido pouco investigado e ainda apresente resultados inconsistentes (Vancassel, Capuron e Castanon, 2018), estudos recentes indicam um interesse terapêutico crescente nessa abordagem.

Um ensaio clínico prospectivo conduzido por Xie et al. (2025) com 160 pacientes diagnosticados com depressão pós-acidente vascular cerebral (AVC) demonstrou que a fototerapia, quando associada ao tratamento convencional, aumentou significativamente os níveis séricos de BH4 em comparação ao grupo controle. Paralelamente, observou-se uma redução expressiva nos escores de depressão avaliados pela escala de Hamilton (HAM-D), que mede a gravidade dos sintomas depressivos. Além disso, a fototerapia levou à diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, TNF- α e IL-1 β . Esses resultados sustentam a hipótese de que o aumento da disponibilidade de BH4 pode contribuir para restaurar a neurotransmissão e atenuar os sintomas depressivos em contextos de neuroinflamação.

Adicionalmente, um estudo de caso publicado por Pan et al. (2011) destacou o impacto clínico de uma deficiência acentuada em BH4 observada em um paciente com quadro psiquiátrico grave, caracterizado por depressão profunda e episódios catatônicos. Esse caso ilustra como uma alteração no metabolismo da BH4 pode se manifestar em transtornos afetivos severos, resistentes às terapias convencionais. Embora se trate de uma observação isolada, ela ressalta a relevância de investigar a via da BH4 como uma perspectiva translacional, capaz de conectar anomalias metabólicas mensuráveis a quadros clínicos complexos.

De forma geral, essas evidências reforçam a ideia de que a modulação da via da BH4 pode representar uma estratégia terapêutica promissora, sobretudo em casos de depressão com componente inflamatório. No entanto, embora as vias endógenas de síntese e reciclagem da BH4 sejam alvos terapêuticos potenciais, sua regulação também pode depender de fatores exógenos e sistêmicos ainda pouco estudados. Entre eles, a microbiota intestinal se destaca por sua capacidade de influenciar o estado inflamatório, a disponibilidade de precursores metabólicos e a produção de moléculas bioativas. O eixo intestino-cérebro, enquanto sistema de comunicação

bidirecional entre o trato digestivo e o sistema nervoso central, surge, portanto, como uma nova perspectiva para compreender de que modo o ambiente microbiano pode participar na regulação da BH4 e, conseqüentemente, na fisiopatologia da depressão.

2.7 O EIXO MICROBIOTA-INTESTINO-CÉREBRO, A DEPRESSÃO E A BH4

Nos últimos anos, tem sido amplamente reconhecido que o intestino não é apenas um órgão digestivo: ele mantém uma comunicação constante com o cérebro por meio do eixo microbiota-intestino-cérebro. Essa comunicação bidirecional baseia-se em interações complexas, nas quais o cérebro pode influenciar a motilidade e o trânsito intestinal, enquanto o microbiota é capaz de modular funções cerebrais e emocionais (O’Riordan et al., 2025; Liu et al., 2023).

Esse eixo integra diversos sistemas interconectados: a microbiota intestinal, o sistema nervoso central e entérico, as vias parassimpáticas e simpáticas, a barreira imunológica e diferentes mediadores neuropeptídicos. Os principais mecanismos envolvem as interações da microbiota com a barreira epitelial intestinal, o sistema imunológico inato e as vias neurais. Nesse contexto, os inflamassomas desempenham um papel essencial como sensores imunológicos, capazes de detectar sinais microbianos e participar da regulação da fisiologia cerebral (Yuan et al., 2023).

O eixo intestino-cérebro constitui um importante modelo teórico para compreender como sinais provenientes do trato gastrointestinal podem modular funções cerebrais complexas, que vão desde o humor até a cognição. Essa abordagem também permite integrar fenômenos aparentemente distintos, como o estresse, a alimentação e a depressão, em um mesmo sistema funcional.

A microbiota interage com o cérebro por meio de vários mecanismos complementares. Um exemplo é a modulação do sistema imunológico. Um desequilíbrio na composição microbiana, conhecido como disbiose, pode aumentar a permeabilidade intestinal e permitir a passagem de moléculas inflamatórias, como o lipopolissacarídeo (LPS), para a circulação. Essa ativação imune crônica favorece um estado de inflamação sistêmica, frequentemente observado em casos de depressão, especialmente quando associados à obesidade ou a distúrbios metabólicos (Capuron, Lasselin e Castanon, 2017; Liu et al., 2023).

Do mais, a microbiota se comunica com o cérebro por meio do nervo vago, transmitindo sinais químicos produzidos por determinadas bactérias e influenciando diretamente regiões cerebrais envolvidas nas emoções, como o hipocampo e a amígdala (Faraji et al., 2025). Essas interações ajudam a explicar por que alterações na microbiota podem se refletir em mudanças de humor e comportamento, especialmente em contextos de inflamação crônica.

Além dos mecanismos imunoinflamatórios, a microbiota também produz metabólitos bioativos, como ácidos graxos de cadeia curta e derivados do triptofano, que modulam hormônios do estresse, o metabolismo energético e a síntese de neurotransmissores essenciais à regulação do humor, como serotonina, dopamina e noradrenalina (Dalile et al., 2019).

Esses processos estão intimamente ligados à via da BH4. Como mencionado anteriormente, a BH4 é um cofator indispensável para as hidroxilases de aminoácidos aromáticos e para as enzimas NOS, centrais nas vias monoaminérgicas e na sinalização por óxido nítrico (Fanet et al., 2021). A inflamação e o estresse oxidativo reduzem a disponibilidade efetiva de BH4, contribuindo para as alterações nos níveis de dopamina, serotonina e noradrenalina observadas em alguns quadros depressivos (Fanet et al., 2021). Assim, ao modular o estado inflamatório e o estresse oxidativo, a microbiota pode influenciar indiretamente a biodisponibilidade da BH4.

Além dessa regulação indireta, há evidências experimentais que sugerem uma contribuição direta da microbiota para a biologia das biopterinas. Em camundongos hph-1 deficientes em GCH1, certos microrganismos intestinais, especialmente algumas Actinobactérias, expressam PTPS-2 e são capazes de produzir BH4, oferecendo uma fonte exógena detectável da molécula (Belik et al., 2017). Embora a extrapolação para humanos deva ser feita com cautela, esses achados apontam para a possibilidade de que uma microbiota produtora de BH4 possa modular de forma mais direta as vias monoaminérgicas do hospedeiro.

Assim, o eixo intestino-cérebro oferece um modelo integrativo que conecta disbiose, inflamação metabólica e neurotransmissão monoaminérgica. A BH4 surge como um ponto central de convergência desses mecanismos, reforçando o interesse em explorar estratégias terapêuticas voltadas à modulação da microbiota, incluindo o uso de bactérias produtoras de BH4, com o objetivo de restaurar a disponibilidade

deste cofator, reduzir a inflamação e atenuar sintomas depressivos associados a estados inflamatórios crônicos. Essa perspectiva abre caminho para uma abordagem terapêutica inovadora baseada na utilização de bactérias produtoras de BH4 no tratamento da depressão relacionada à inflamação crônica.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo é avaliar, em um modelo murino de depressão induzida por dieta rica em gorduras, o potencial terapêutico de cepas bacterianas produtoras de BH4 sobre as alterações comportamentais e biológicas associadas ao estado depressivo. De forma mais específica, busca-se analisar o efeito da administração dessas cepas no comportamento ansioso e depressivo, além de investigar suas repercussões na biodisponibilidade central e periférica de BH4, no equilíbrio das vias monoaminérgicas que envolvem serotonina, dopamina e noradrenalina, bem como na expressão de citocinas pró-inflamatórias que refletem o estado inflamatório sistêmico.

4 HIPÓTESES

Com base nas evidências da literatura, que indicam uma relação entre disbiose intestinal, inflamação sistêmica e alterações nas vias monoaminérgicas envolvidas na regulação do humor, este estudo parte das seguintes hipóteses:

- A administração de cepas bacterianas produtoras de BH4 é capaz de atenuar comportamentos depressivos em um modelo murino de depressão induzida por dieta rica em gorduras.
- O tratamento com essas cepas melhora a biodisponibilidade central e periférica de BH4, favorecendo o equilíbrio das vias monoaminérgicas da serotonina, dopamina e noradrenalina.
- A modulação da microbiota por meio de bactérias produtoras de BH4 reduz a expressão de citocinas pró-inflamatórias e o estado inflamatório sistêmico associado ao quadro depressivo.

Essas hipóteses buscam orientar a investigação dos mecanismos biológicos pelos quais a microbiota intestinal, por meio da produção de BH4, pode atuar na interface entre metabolismo, inflamação e comportamento depressivo.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo foi realizado com 64 camundongos machos da linhagem C57BL/6J, com 16 semanas de idade, adquiridos da empresa Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, França). Desde o desmame, dezesseis animais foram alimentados com uma dieta padrão, constituindo o grupo controle. Os 48 camundongos restantes receberam uma dieta hiperlipídica, com o objetivo de induzir o desenvolvimento de um fenótipo de obesidade.

Após a chegada ao biotério, os animais foram alojados em grupos de oito, em gaiolas padrão de polipropileno, mantidas em ambiente com temperatura e umidade controladas e com um ciclo de luz de 12 horas (das 7h às 19h). Antes do início da fase experimental, foi respeitado um período mínimo de dez dias de aclimação para adaptação ao novo ambiente.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê Nacional de Ética para o Cuidado e Uso de Animais (autorização nº 50825), e todos os procedimentos seguiram as diretrizes estabelecidas pela Diretiva Europeia 2010/63/UE, que regulamenta a proteção de animais utilizados para fins científicos.

No início do experimento, os 16 camundongos controle e os 48 obesos foram distribuídos de forma equilibrada em quatro grupos, com 16 animais em cada um:

- Grupo Controle (C): recebeu uma dieta padrão (A04, SAFE, França), na qual 8,4% das calorias eram provenientes de lipídios.
- Grupo HF: recebeu uma dieta hiperlipídica (HF) contendo 60% das calorias provenientes de lipídios (D12492i, Research Diets Inc., EUA).
- Grupo HF-B1: recebeu a mesma dieta HF, associada a um tratamento diário por gavagem oral com 200 µL de uma suspensão bacteriana B1, contendo 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC) por 200 µL.
- Grupo HF-B2: recebeu a dieta HF, associada a um tratamento diário por gavagem oral com 200 µL de uma suspensão bacteriana B2, contendo 10⁹ unidades formadoras de colônia (UFC) por 200 µL.

Essa divisão permitiu comparar os efeitos da dieta hiperlipídica isoladamente e em associação ao tratamento com diferentes cepas bacterianas produtoras de BH4. A composição das dietas está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição das dietas.

Nutriente	Dieta padrão SAFE® A04 (% de energia)	Dieta HF Research Diets Inc.® D12492 (% de energia)
Lipídios	8,4	60
Carboidratos	72,3	20
Proteínas	19,3	20

Os valores indicam a porcentagem de energia proveniente de lipídios, carboidratos e proteínas nas dietas padrão (SAFE® A04) e hiperlipídica (Research Diets Inc.® D12492).

Os animais dos grupos HF, HF-B1 e HF-B2 que não atingiram peso médio de 39,9 g, considerando a média do dia de chegada, da fase de habituação e do primeiro dia de protocolo, foram excluídos das análises. Esses animais foram considerados não respondedores ao modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, o que sugere uma resistência ao ganho de peso, mesmo após exposição prolongada à alimentação rica em gorduras.

A literatura já descreve esse fenômeno, em que alguns animais submetidos a dietas hiperlipídicas não desenvolvem obesidade, mesmo sob as mesmas condições experimentais (Milhem et al., 2024). O valor de 39 g foi escolhido porque representava o peso máximo observado no grupo controle alimentado com dieta padrão. Os dados referentes ao peso nesses três momentos estão apresentados no Apêndice I.

5.2 TRATAMENTOS E PROTOCOLO EXPERIMENTAL

As duas cepas bacterianas utilizadas neste estudo são actinobactérias Gram-positivas e estritamente anaeróbias, produtoras de BH4. Ambas pertencem ao mesmo gênero, mas a espécies diferentes. A cepa B1 é uma cepa padrão, previamente identificada e caracterizada em laboratório. A cepa B2, por sua vez, foi isolada da microbiota humana pela empresa NovoBiome (Latresne, França).

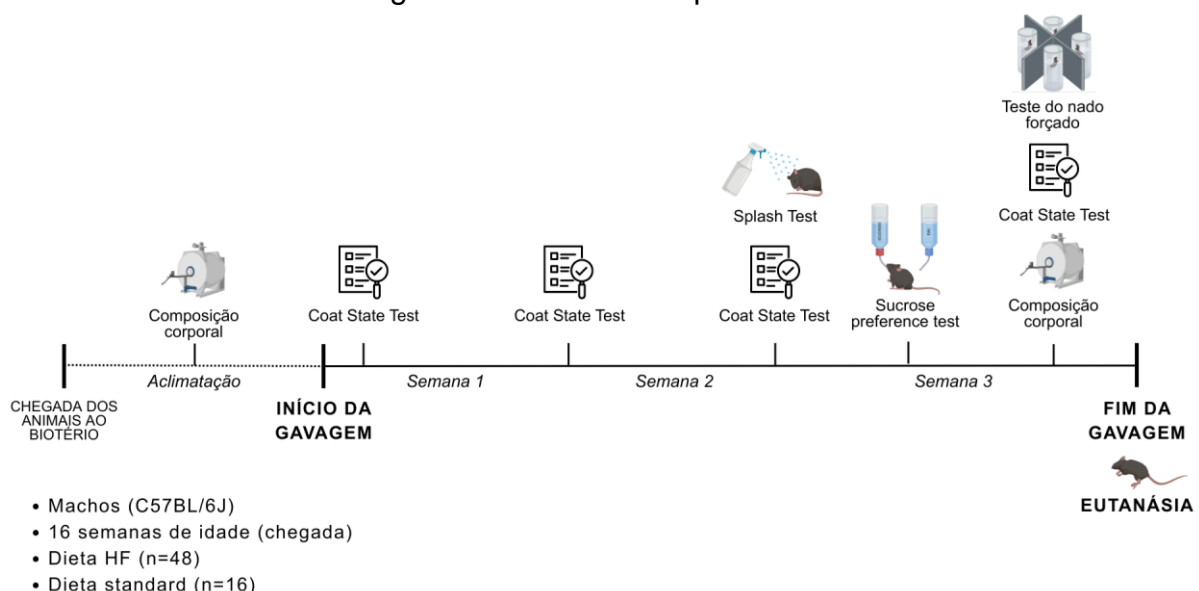
Por motivos de confidencialidade e respeito à propriedade intelectual do laboratório, o gênero e a espécie exatos dessas bactérias não são divulgados neste

trabalho. Cada cepa foi administrada diariamente por gavagem oral na dose de 10^8 UFC/200 μ L por animal para B1 e de 10^9 UFC/200 μ L por animal para B2, durante 21 dias consecutivos, após ressuspensão em PBS 1X. Os grupos Controle e HF receberam o mesmo volume de PBS 1X, para controlar o efeito do procedimento de gavagem.

Durante o protocolo experimental, foram realizados diferentes testes comportamentais para avaliar comportamentos relacionados à ansiedade e à depressão, conforme ilustrado na Figura 4. Foram aplicados o teste de avaliação do estado da pelagem (Coat State), o Splash Test, o teste de preferência por sacarose (Sucrose Preference Test) e o teste de nado forçado (Forced Swim Test). Cada um desses procedimentos é descrito detalhadamente nas seções seguintes da metodologia.

Além dos testes comportamentais, também foi feita uma análise da composição corporal por meio de ressonância magnética nuclear de tempo de relaxamento (TD-NMR) (Bruker Minispec LF90, Bruker Corporation, Billerica, MA, EUA). Essa análise foi realizada uma vez durante a fase de aclimação e novamente no último dia do protocolo, antes da eutanásia dos animais.

Figura 4 – Protocolo experimental.



Esquema ilustrando a cronologia dos procedimentos aplicados a camundongos machos (16 semanas) submetidos a uma dieta padrão ou a uma dieta rica em gorduras (HFD), suplementadas ou não com bactérias. Os animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais: teste TD-NMR, avaliação do estado da pelagem (Coat State), labirinto em cruz elevada (EPM), splash test, teste de

preferência por sacarose (SPT) e teste de nado forçado (FST). Os animais foram eutanasiados no dia 2 (Figura criada com Biorender®; fonte: autora)

Ao final do experimento, os animais foram anestesiados por meio de uma injeção subcutânea de buprenorfina (0,1 mg/kg) e, em seguida, eutanasiados por injeção intraperitoneal de Euthasol (400 mg/kg). O sangue foi imediatamente coletado por punção cardíaca e mantido em gelo, sendo depois centrifugado (10 min × 3.000 rpm × 4 °C) para separar o plasma. A esse plasma foi adicionada uma solução antioxidante (ácido ascórbico 20% em HCl 0,1 N; 4 °C) (Khan et al., 2013) a fim de prevenir a oxidação da molécula de interesse, a BH4. As amostras de plasma assim preparadas foram posteriormente armazenadas a –80 °C.

Após a coleta de sangue, os animais foram perfundidos com PBS 1X a um fluxo constante de 3,5 ml/min. Imediatamente após a decapitação, as estruturas cerebrais de interesse, incluindo o estriado, o córtex pré-frontal, o hipocampo, o hipotálamo e o restante do córtex, foram cuidadosamente dissecadas sobre gelo para preservar sua integridade. Cada estrutura foi colocada em microtubos previamente identificados, mantidos em gelo seco e, em seguida, armazenados a –80 °C para análises posteriores.

Por fim, os tecidos periféricos (como fígado, cólon e íleo), assim como o conteúdo cecal, também foram coletados sob as mesmas condições de manipulação, armazenados em gelo seco imediatamente após a coleta e congelados a –80 °C até o momento de sua utilização.

5.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

A fim de avaliar o impacto dos diferentes tratamentos sobre o comportamento dos animais, foi implementada uma série de testes comportamentais padronizados: Splash Test, Coat State Test (Teste do Estado da Pelagem), Forced Swim Test (FST – Teste do Nado Forçado) e o Sucrose Preference Test (SPT – Teste de Preferência por Sacarose). Cada um desses protocolos visa explorar diferentes aspectos do comportamento emocional e motivacional, que será descrito em detalhe nas seções seguintes.

5.3.1 Teste do Estado da Pelagem (Coat State Test)

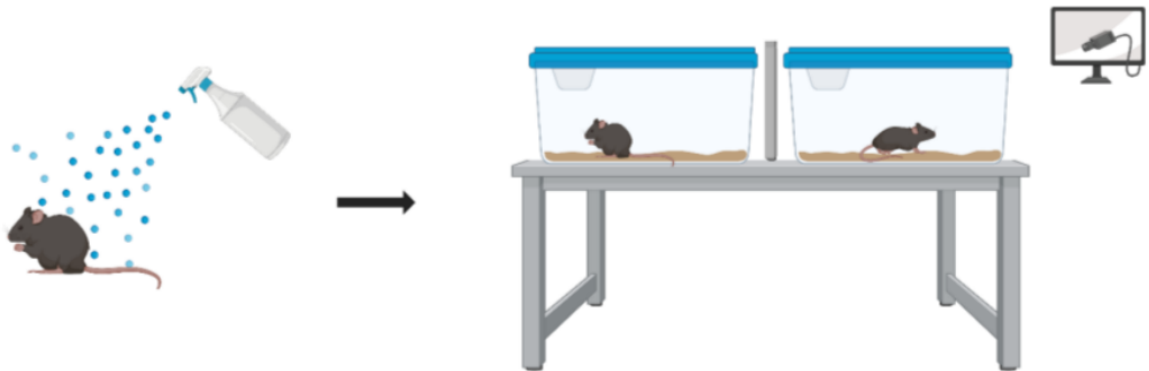
Esse teste permite avaliar a diminuição dos comportamentos de auto-higiene, considerada um indicador de tipo depressivo em camundongos. Para isso, o estado da pelagem foi inspecionado dividindo-se o corpo do animal em sete regiões: cabeça, pescoço, dorso, abdômen, patas anteriores, patas posteriores e região genital, conforme descrito por Yalcin, Belzung e Surget (2008). Cada região foi avaliada segundo uma escala binária: 0 para pelagem limpa e 2 para pelagem suja, resultando em uma pontuação total que varia de 0 a 14 por animal. Uma pontuação elevada reflete uma deterioração dos comportamentos de limpeza.

5.3.2 Splash Test

O Splash Test é um teste comportamental utilizado para avaliar os comportamentos de auto-higiene e a motivação para o cuidado pessoal em roedores. Trata-se de um indicador usado para detectar sintomas de tipo depressivo, especialmente aqueles relacionados à perda de interesse em auto-higiene. O protocolo foi realizado conforme descrito por Yalcin, Aksu e Belzung (2005), com algumas modificações menores.

O teste foi conduzido em gaiolas individuais, com dois animais sendo testados simultaneamente, mas posicionados de forma a não se verem, a fim de evitar qualquer estímulo visual que pudesse influenciar o comportamento. Cada sessão teve duração de 5 minutos. Uma solução de sacarose a 10% foi pulverizada sobre a região dorsal de cada camundongo utilizando um borrifador manual. Essa solução torna a pelagem pegajosa, induzindo um comportamento natural de limpeza (*grooming*). A quantidade aplicada foi suficiente para umedecer a pelagem sem causar desconforto significativo. A Figura 5 ilustra a disposição dos animais durante o teste.

Figura 5 – Esquema do Splash Test.



A pelagem do camundongo é pulverizada com uma solução açucarada para estimular o comportamento de limpeza. O tempo gasto no ato de se limpar é medido como um indicador de motivação e estado emocional (Feito com Biorender®, fonte: autora).

A análise comportamental foi realizada a partir dos registros em vídeo, utilizando o software Noldus EthoVision XT (Noldus Information Technology, Wageningen, Países Baixos). Esse programa permite quantificar de maneira automatizada e precisa diversos parâmetros comportamentais, como duração, frequência e intensidade dos comportamentos observados, reduzindo a subjetividade inerente à avaliação manual. No caso do Splash Test, os comportamentos medidos incluíram a latência e a duração do comportamento de limpeza (*grooming*).

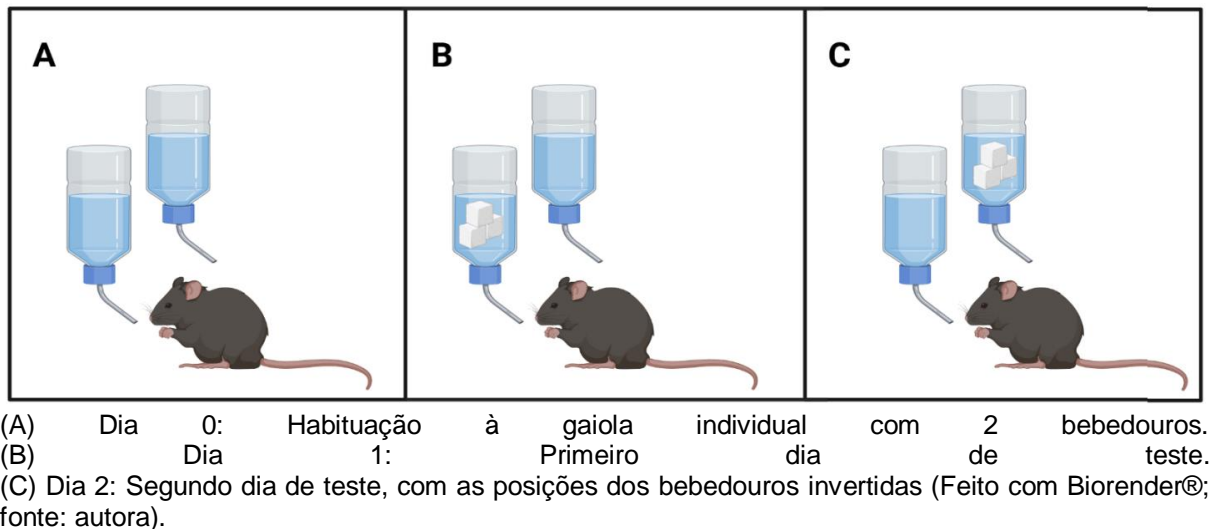
5.3.3 Teste de Preferência pela Sacarose (SPT)

O teste de preferência pela sacarose foi realizado com o objetivo de avaliar a anedonia, definida como a diminuição da sensibilidade a estímulos normalmente prazerosos, um sintoma central dos transtornos depressivos. Esse protocolo, validado e amplamente utilizado em modelos animais de depressão (Willner et al., 1987), permite estimar a perda de interesse por uma solução açucarada, que é normalmente apreciada pelos roedores.

Inicialmente, os camundongos são alojados individualmente e expostos, durante 24 horas, a dois bebedouros contendo apenas água, para que se habituem à presença simultânea de duas fontes de líquido. Após essa fase de habituação, um dos bebedouros é preenchido com uma solução de sacarose a 2%, enquanto o outro permanece com água pura. Os bebedouros são pesados imediatamente antes do início do teste e ao final de cada dia, a fim de medir com precisão os volumes consumidos.

O teste é conduzido ao longo de dois dias consecutivos. Ao final do primeiro dia, as posições dos bebedouros em cada gaiola são invertidas (o bebedouro contendo a solução açucarada é colocado do outro lado) para controlar possíveis efeitos de lateralização nas escolhas dos animais (cf. Figura 6).

Figura 6 – Esquema do Teste de Preferência por Sacarose.



A preferência pela sacarose é calculada da seguinte forma:

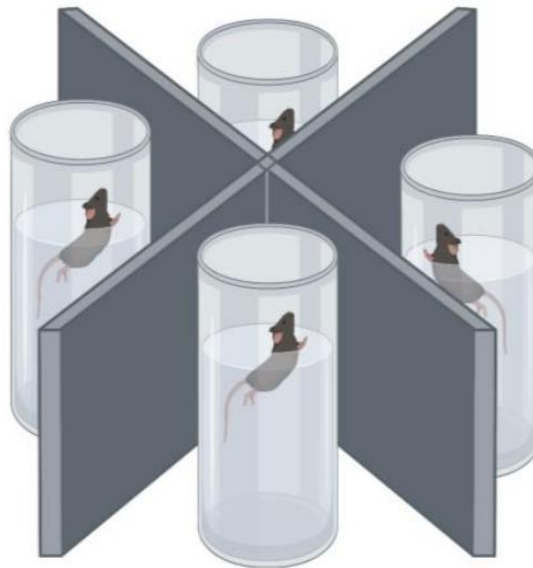
$$\text{Preferência (\%)} = \left(\frac{\text{Volume de sacarose}}{\text{Volume total: sacarose + água}} \right) \times 100.$$

Uma diminuição significativa dessa preferência é interpretada como um marcador de anedonia.

5.3.4 Teste de Nado Forçado (FST)

O *Forced Swim Test* (FST) é amplamente utilizado para avaliar o comportamento de resignação em roedores, considerado um indicador de sintomas de tipo depressivo. O protocolo foi realizado conforme descrito por Porsolt et al. (1977), com algumas modificações. O teste foi conduzido com quatro animais simultaneamente, de forma randomizada, utilizando quatro cilindros de vidro independentes, com dimensões padronizadas, preenchidos com água a 25 °C. Os recipientes foram dispostos de maneira a impedir qualquer interação visual entre os animais, a fim de minimizar influências comportamentais cruzadas (ver Figura 7).

Figura 7 – Esquema do Teste do Nado Forçado.



(Feito com Biorender®; fonte: autora)

Cada camundongo foi submetido a uma única sessão de 6 minutos de nado forçado, registrada em vídeo para posterior análise comportamental. O principal parâmetro avaliado foi o tempo de imobilidade, definido como a ausência de movimentos ativos de nado ou de tentativas de fuga. Esse comportamento passivo é interpretado como um marcador de resignação diante do estresse.

Assim como no Splash Test, os vídeos do FST foram analisados utilizando o software Noldus EthoVision XT (Noldus Information Technology, Wageningen, Países Baixos).

5.4 EVOLUÇÃO PONDERAL E COMPOSIÇÃO CORPORAL

O peso corporal dos animais foi medido diariamente ao longo de toda a experimentação, desde o período de habituação até o dia da eutanásia. As pesagens foram realizadas em horário fixo, utilizando uma balança eletrônica de precisão. Esse acompanhamento regular permitiu monitorar a evolução individual do peso corporal, em relação às dietas, aos tratamentos administrados e ao estado geral dos animais.

A avaliação da composição corporal foi realizada em dois momentos-chave: durante a semana de habituação e no dia da eutanásia. A técnica utilizada baseia-se na ressonância magnética nuclear em domínio de tempo (Time-Domain Nuclear Magnetic Resonance, TD-NMR), com o aparelho Bruker Minispec LF90 (Bruker Corporation, Billerica, MA, EUA).

Cada camundongo foi colocado individualmente em um tubo apropriado, sem anestesia, para uma medição rápida e não invasiva. O equipamento permite quantificar de forma precisa a proporção de massa gorda e massa magra de cada animal.

5.5 ANÁLISE DAS MONOAMINAS NOS TECIDOS CEREBRAIS

A análise dos neurotransmissores monoaminérgicos foi realizada em três estruturas cerebrais de interesse, envolvidas na regulação do humor: o estriado, o córtex pré-frontal e o hipocampo.

5.5.1. Extração das monoaminas

A extração das monoaminas cerebrais (dopamina, noradrenalina e serotonina) foi realizada a partir de tecidos congelados (estriado, córtex pré-frontal e hipocampo), segundo o método descrito por Fanet (2018). Cada estrutura foi pesada individualmente sobre gelo seco e, em seguida, homogeneizada com o TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Alemanha) em uma solução de extração previamente resfriada (0,005 M de ácido 1-octanossulfônico, 0,1 mM de EDTA dissódico, 1 mM de dissulfito de sódio e 0,1 N de ácido perclórico). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 15 000 × g por 20 minutos a 4 °C, e o sobrenadante obtido foi filtrado em microtubos com membranas filtrantes (Spin-X®, Corning, EUA) antes da análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção eletroquímica (HPLC-ECD). Os lisados foram armazenados a –80 °C até o uso.

5.5.2. Quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As concentrações de monoaminas cerebrais foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção eletroquímica (HPLC-ECD; +0.7V Decade II), conforme descrito por Monchaux De Oliveira et al. (2021). As amostras foram injetadas em um sistema HPLC equipado com uma coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm, mantida a 25 °C).

A fase móvel era composta por 15% de metanol, 0,1 mM de EDTA, 0,1 M de acetato de sódio, 0,1 M de ácido cítrico, 1 mM de dietilamina e 1 mM de ácido octanossulfônico, com fluxo constante de 0,7 mL/min.

A identificação e quantificação dos picos cromatográficos foram realizadas por comparação com padrões externos. As concentrações obtidas foram normalizadas em função do peso do tecido analisado.

5.5 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE BH4 NO CÓLON E NO PLASMA

5.6.1 Extração da tetrahydrobiopterina (BH4) e da dihydrobiopterina (BH2)

A extração de tetrahydrobiopterina (BH4) e dihydrobiopterina (BH2) foi realizada a partir de amostras de plasma e de tecidos de cólon, seguindo um protocolo interno desenvolvido no laboratório. As amostras foram homogeneizadas a frio em uma solução de extração contendo ácido fórmico, vitamina C, DTT e EDTA, com o objetivo de precipitar proteínas e proteger a BH4 da oxidação.

A homogeneização foi realizada com um sistema mecânico de trituração por esferas (TissueLyser II, Qiagen, Alemanha), utilizando ciclos sucessivos de agitação em alta frequência, intercalados com períodos de incubação em gelo. Para as amostras de plasma, a etapa de trituração foi substituída por sonicação em banho ultrassônico (Bioruptor® Pico, Hologic Diagenode, Liège, Bélgica).

Após a homogeneização, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) aos extratos, em volume proporcional à massa do tecido, para garantir uma desproteinização completa. As amostras foram então centrifugadas a 21 000 × g por 5 minutos a 4 °C, e o sobrenadante obtido foi transferido para tubos pré-resfriados, seguido de uma segunda centrifugação prolongada (30 a 60 minutos a 21 000 × g, 4 °C). Os sobrenadantes foram filtrados em microtubos com filtros Nanosep 10K Omega (#OD010C35, Pall Corporation, Port Washington, EUA) e imediatamente congelados a -80 °C até a análise.

5.6.2 Quantificação de BH4 e BH2

A quantificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS). As análises foram conduzidas em um laboratório parceiro, o *Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires* (UMR 5095, CNRS), equipado com um sistema HPLC-MS de alta sensibilidade, que permite a detecção específica e precisa de BH4 e BH2 em matrizes biológicas. Os resultados foram expressos em função do peso do tecido analisado.

5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares GraphPad Prism (versão 8) e R. A normalidade das distribuições foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade das variâncias foi verificada pelo teste de Levene. Para as análises de variância, quando os dados não apresentavam distribuição normal, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste post hoc de Dunn.

Quando as condições de aplicação eram atendidas, realizou-se uma ANOVA (de um ou dois fatores), seguida do teste post hoc de Tukey. As comparações entre dois grupos foram feitas utilizando o teste t de Student ou, em caso de não normalidade, o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM).

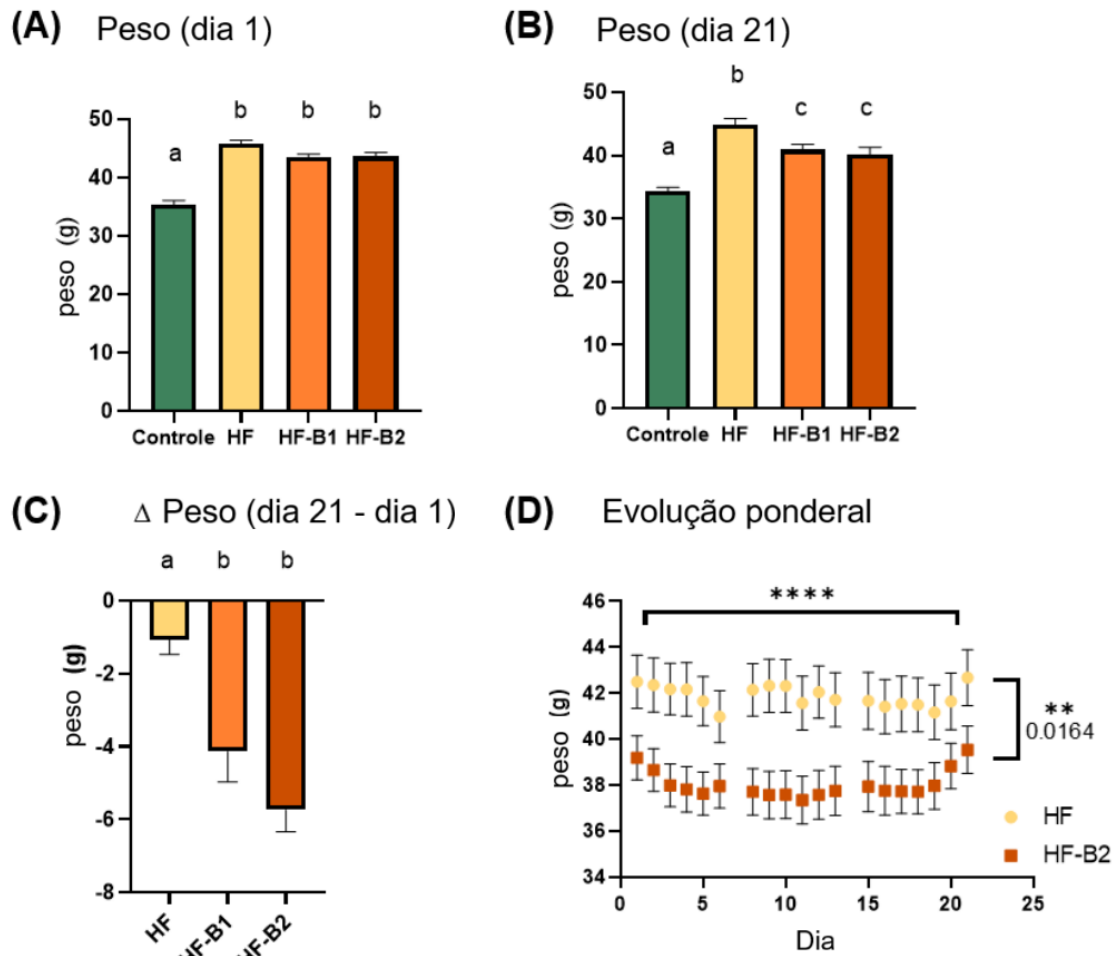
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 RESULTADOS

6.1.1 Acompanhamento do peso e da composição corporal

O acompanhamento do peso, realizado ao longo de toda a experimentação, permite avaliar o impacto da dieta e dos tratamentos sobre o ganho de peso durante o protocolo (Figura 8).

Figura 8 – Evolução do peso ao longo do protocolo experimental.



(A) Peso inicial (D1): os grupos HF, HF-B1 e HF-B2 apresentam peso significativamente superior ao grupo controle ($p < 0,0001$). **(B)** Peso final (D21): o grupo HF mantém um peso mais elevado, enquanto os grupos HF-B1 e HF-B2 exibem uma redução significativa em relação ao grupo HF ($p < 0,05$). **(C)** Variação de peso (Δ peso D21 – D1): perda de peso acentuada nos grupos suplementados (HF-B1, HF-B2) em comparação ao grupo HF ($p < 0,05$). **(D)** Evolução diária do peso (D1–D21): diminuição progressiva e significativa do peso no grupo HF-B2 em relação ao grupo HF ($p = 0,0164$). Os resultados são expressos como média \pm SEM. (a,b,c): diferença significativa entre os grupos; ANOVA de um ou dois fatores, seguida pelo teste de Tukey e/ou testes t de Student para comparações par a par (Fonte: autora)

No dia 1 (Figura 8.A), os grupos submetidos à dieta rica em gorduras (HF, HF-B1 e HF-B2) apresentaram um peso inicial significativamente superior ao do grupo controle (C) ($p < 0,0001$). No dia 21 (Figura 8.B), o grupo HF sozinho manteve um peso significativamente maior que o grupo C, enquanto os grupos tratados (HF-B1 e HF-B2) exibiram uma redução significativa em relação ao grupo HF ($p = 0,036$ e $p = 0,008$, respectivamente). Essa tendência foi confirmada pela análise da variação de peso (Δ peso D21 – D1, Figura 8.C).

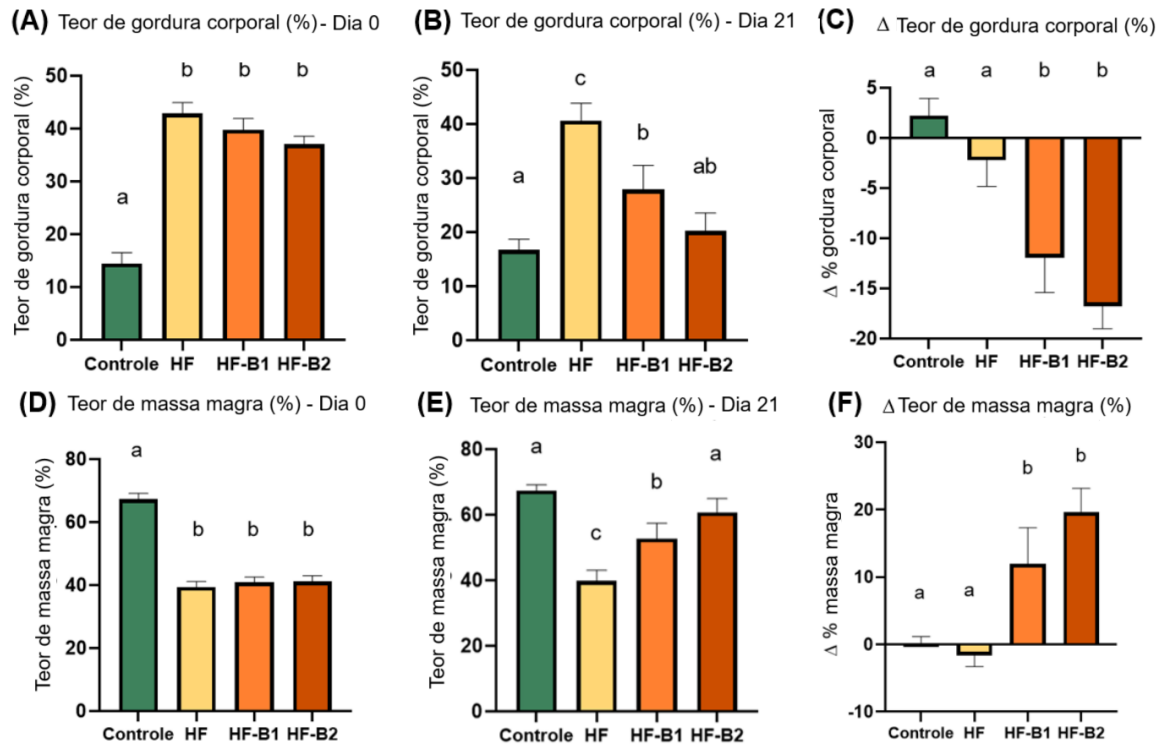
Os grupos HF-B1 e HF-B2 apresentaram uma perda de peso acentuada e significativa, com uma diminuição média de -9,2% ($p = 0,049$) e -11,3% ($p < 0,0001$) do peso corporal inicial, respectivamente, em comparação com o grupo HF. No

entanto, o peso dos grupos HF-B1 e HF-B2 permaneceu ainda significativamente superior ao do grupo C.

A evolução diária do peso (Figura 8.D) evidencia que os animais do grupo HF-B2 apresentaram uma redução progressiva e contínua da massa corporal em relação ao grupo HF, diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0164$). No conjunto, esses dados indicam que as suplementações bacterianas testadas — especialmente no grupo HF-B2 — induzem perda de peso em animais submetidos a uma dieta rica em gorduras.

A composição corporal foi avaliada por TD-NMR a fim de determinar a evolução da massa gorda e da massa magra ao longo do tratamento. As medições foram realizadas antes do início do protocolo (D0) e no momento da eutanásia (D21), permitindo assim observar o impacto dos tratamentos (suplementações bacterianas) sobre a dinâmica dos compartimentos corporais. Os resultados dessas medições são apresentados na Figura 9.

Figura 9 – Efeitos dos tratamentos sobre a composição corporal dos camundongos.



(A, D) Em D0, os camundongos do grupo HF apresentaram uma massa gorda significativamente maior e uma massa magra menor do que os controles ($p < 0,0001$), sem diferença entre HF, HF-B1 e HF-B2. (B, E) Em D21, a massa gorda permaneceu elevada no grupo HF, enquanto foi significativamente reduzida nos grupos HF-B1 ($p = 0,0383$) e HF-B2 ($p = 0,0005$). Paralelamente, a massa magra aumentou nos grupos tratados, com um efeito mais pronunciado para HF-B2 ($p = 0,0009$) do que para HF-B1 ($p = 0,049$). Os valores do grupo HF-B2 não diferiram significativamente dos do grupo controle. (C, F) A análise das variações (D21–D0) confirmou esses resultados: redução significativa da massa gorda e aumento da massa magra nos grupos HF-B1 e HF-B2 em comparação ao grupo HF. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). (a,b,c): diferença significativa entre grupos; ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey e/ou testes t de Student para comparações entre dois grupos, ou testes não paramétricos equivalentes (Fonte: autora)

Em D0 (Figura 9.A), os camundongos do grupo HF já apresentavam uma massa gorda significativamente maior do que os do grupo C (42,2% contra 14,5%, $p < 0,0001$). Nenhuma diferença foi observada entre os grupos HF, HF-B1 e HF-B2, confirmando assim uma distribuição homogênea dos animais antes do início dos tratamentos. Em D21 (Figura 9.B), as diferenças entre os grupos tornam-se muito mais evidentes. O grupo HF manteve uma alta porcentagem de massa gorda (42%) em comparação ao grupo C (18,3%, $p = 0,0003$). No entanto, os tratamentos modificaram significativamente a composição corporal. De fato, os camundongos do grupo HF-B1 apresentaram uma redução da massa gorda em relação aos do grupo HF ($p = 0,0383$). O efeito foi ainda mais pronunciado no grupo HF-B2, cuja massa gorda diminuiu fortemente em comparação com o grupo HF ($p = 0,0005$), atingindo valores semelhantes aos do grupo C.

Com relação à massa magra em D0 (Figura 9.D), observou-se a tendência inversa: os camundongos do grupo C apresentaram uma massa magra superior à dos grupos HF, HF-B1 e HF-B2 (67,2% contra 40,4%, $p < 0,0001$). Novamente, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos HF, HF-B1 e HF-B2 antes do início dos tratamentos. Em D21 (Figura 9.E), as diferenças tornaram-se nítidas entre o grupo HF e os grupos tratados (HF-B1 e HF-B2). Observou-se um aumento significativo da massa magra nos camundongos que receberam os tratamentos, sendo o efeito mais pronunciado no grupo HF-B2 ($p = 0,0009$) do que no grupo HF-B1 ($p = 0,049$). Notavelmente, os valores observados para o grupo HF-B2 não diferiram significativamente dos do grupo C, sugerindo que o tratamento B2 permitiu restaurar um nível de massa magra comparável ao normal.

A análise das variações entre D21 e D0 confirma esses resultados. Para a massa gorda (Figura 9.C), os grupos HF-B1 e HF-B2 apresentaram uma redução significativa em relação ao grupo HF ($p = 0,0429$ e $p = 0,0003$, respectivamente), enquanto nenhuma diferença foi observada entre HF e C. Quanto à massa magra (Figura 9.F), os camundongos HF-B1 e HF-B2 mostraram um aumento significativo em relação aos do grupo HF ($p = 0,034$ e $p = 0,0007$, respectivamente).

Em resumo, o tratamento B2 induziu os efeitos mais expressivos, restabelecendo uma composição corporal próxima à do grupo C. O tratamento B1, embora menos potente, também reduziu significativamente a massa gorda e aumentou a massa magra em comparação ao grupo HF.

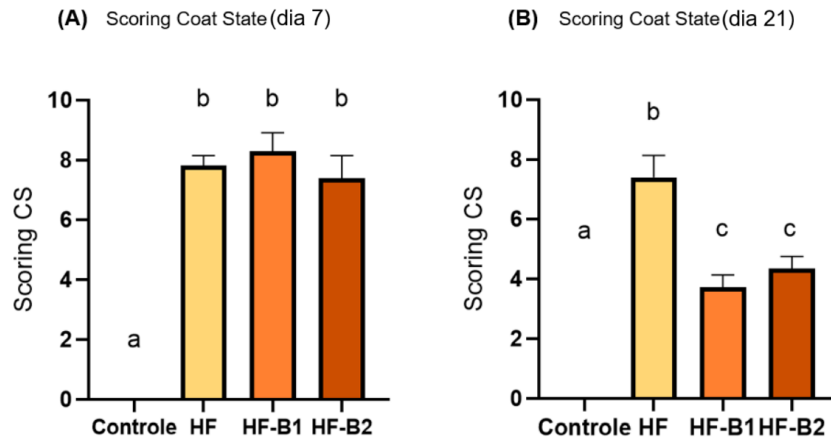
6.1.2. Avaliação do estado da pelagem (Coat State Test – CS)

Os resultados referentes à avaliação do estado da pelagem (Coat State Test) são apresentados na Figura 10. Em D7, o escore médio foi de 0 para o grupo C, contra 7,7 para o grupo HF ($p < 0,0001$). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos HF, HF-B1 e HF-B2 em D7 (Figura 10.A).

Em D21, o escore do grupo C permaneceu em 0, enquanto o do grupo HF foi de 7,4 (Figura 13.B). Em contrapartida, em D21, os grupos HF-B1 e HF-B2 apresentaram uma redução significativa no escore médio em comparação ao grupo HF (3,7 e 4,4 versus 7,4, respectivamente, com $p < 0,0001$ e $p = 0,0006$). No entanto,

esses escores ainda permaneceram significativamente mais altos do que os do grupo C.

Figura 10 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre o estado da pelagem (Coat-State Test) nos dias 7 (A) e 21 (B).



O grupo HF apresenta um escore significativamente mais alto que o controle em D7 e D21. Em D21, os grupos HF-B1 e HF-B2 mostram uma redução significativa do escore em comparação ao grupo HF ($p < 0,0001$ e $p = 0,0006$, respectivamente). Resultados expressos como média \pm EPM. (a,b,c): significativamente diferentes entre os grupos; ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey e/ou testes t de Student para comparações entre dois grupos, ou testes não paramétricos equivalentes (Fonte: autora).

Esses resultados sugerem que a obesidade induzida pela dieta rica em gordura (HF) está associada a uma deterioração do estado da pelagem, e que esse efeito é atenuado pelos tratamentos com B1 e B2.

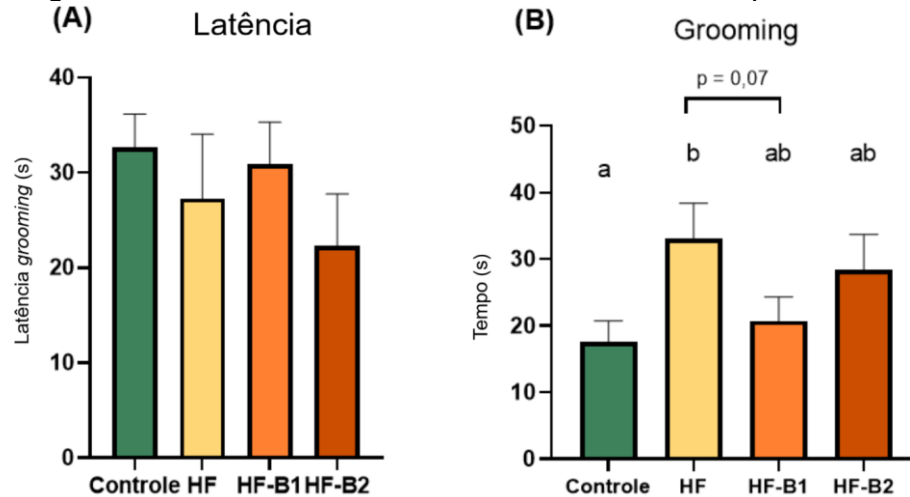
6.1.3 Splash Test

Os resultados do teste não revelaram diferenças significativas entre os grupos quanto à latência antes do início do comportamento de higiene (Figura 14.A). Entretanto, diferenças notáveis foram observadas para a duração total do toilettage (Figura 14.B). O grupo HF apresentou um tempo de higiene significativamente maior que o grupo C ($p < 0,05$). Os grupos HF-B1 e HF-B2 apresentaram valores intermediários, que não diferiram estatisticamente nem do grupo HF nem do grupo C (notações "ab"). Observou-se uma tendência de redução do toilettage no grupo HF-B1 em comparação ao grupo HF ($p = 0,065$).

Esses resultados sugerem que a obesidade induzida pelo regime HF está associada a um aumento do comportamento de higiene, possivelmente refletindo uma alteração do estado emocional. Os tratamentos testados parecem atenuar parcialmente essa resposta, embora sem atingir uma normalização completa em

relação aos animais controle, devido à grande variabilidade interindividual dessa variável.

Figura 11 – Efeitos dos diferentes tratamentos no Splash Test.



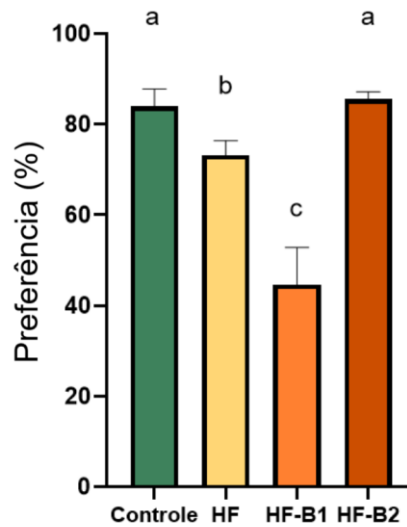
As variáveis medidas foram a latência antes do primeiro comportamento de higiene (A) e a duração total do toilettage (B) no teste de splash. Resultados expressos como média \pm EPM. (a,b): significativamente diferentes entre os grupos; ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey e/ou testes t de Student para comparações par a par, ou testes não paramétricos equivalentes (Fonte: autora)

6.1.4 Teste de Preferência pela Sucrose

No teste de preferência pelo sucrose, diferenças significativas foram observadas entre os grupos (Figura 15). O grupo C apresentou forte preferência pela solução açucarada (~85%), significativamente reduzida nos animais obesos HF (~73%, $p = 0,01$). Essa redução foi ainda mais pronunciada no grupo HF-B1, que apresentou o valor mais baixo (~45%, $p < 0,05$ vs C e HF). Por outro lado, o grupo HF-B2 recuperou uma preferência pelo sucrose comparável à do grupo C, significativamente maior que a dos grupos HF e HF-B1 ($p < 0,001$).

Esses resultados mostram que a obesidade induzida pelo regime HF está associada à diminuição da preferência pelo sucrose, refletindo anedonia. No entanto, o efeito varia conforme o tratamento: enquanto o grupo HF-B1 apresentou agravamento desse fenótipo, o grupo HF-B2 demonstrou restauração completa da preferência pelo sucrose, sugerindo efeito positivo sobre a anedonia.

Figura 12 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a preferência pela sucrose.



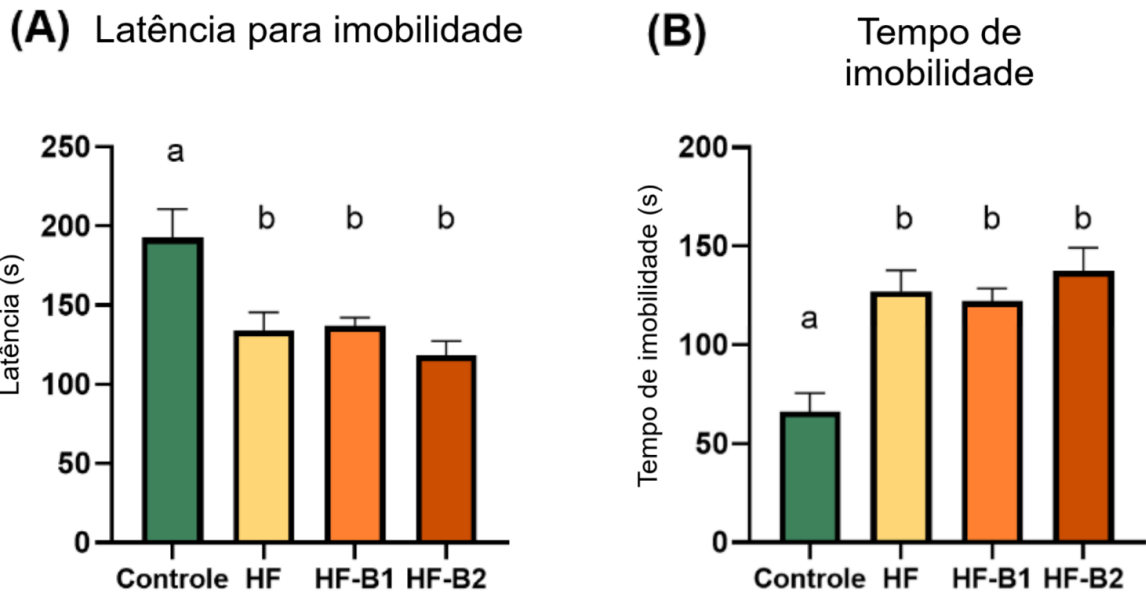
A preferência foi calculada segundo a fórmula: $\text{Preferência (\%)} = \left(\frac{\text{Volume da solução de sucrose}}{\text{Volume total [sucrose + água]}} \right) \times 100$. Resultados expressos como média \pm EPM. (a,b,c): significativamente diferentes entre os grupos; ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey e/ou testes t de Student para comparações par a par, ou testes não paramétricos equivalentes (Fonte: autora).

6.1.5 Teste de Natação Forçada (Forced Swim Test - FST)

No teste de natação forçada (FST), foram observadas diferenças significativas entre os grupos para os dois parâmetros analisados (Figura 16). A latência antes da primeira imobilidade (Figura 16.A) foi significativamente reduzida nos grupos HF, HF-B1 e HF-B2 em comparação ao grupo C ($p < 0,05$). Inversamente, o tempo total de imobilidade (Figura 16.B) foi significativamente maior nos grupos HF e tratados (HF-B1, HF-B2) do que nos animais do grupo C ($p < 0,05$), sem diferenças entre HF-B1 e HF-B2.

Esses resultados indicam que o modelo HF reproduz as alterações comportamentais esperadas, com redução significativa da latência à imobilidade e aumento do tempo de imobilidade em relação aos controles, sugerindo comportamento de resignação. As suplementações bacterianas testadas não modificaram esse comportamento.

Figura 13 – Efeitos dos diferentes tratamentos no FST.



As variáveis medidas foram a latência antes da primeira imobilidade (A) e o tempo total de imobilidade (B). Resultados expressos como média \pm EPM. (a,b): significativamente diferentes entre os grupos; ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey e/ou testes t de Student para comparações par a par, ou testes não paramétricos equivalentes (Fonte: autora)

6.1.6 Análise da concentração de BH4 e BH2 no cólon e no plasma

Para avaliar o impacto da dieta rica em gorduras e dos tratamentos HF-B1 e HF-B2 no metabolismo das pterinas, foram medidas as concentrações de BH2 e BH4 no plasma e no cólon (Figura 14).

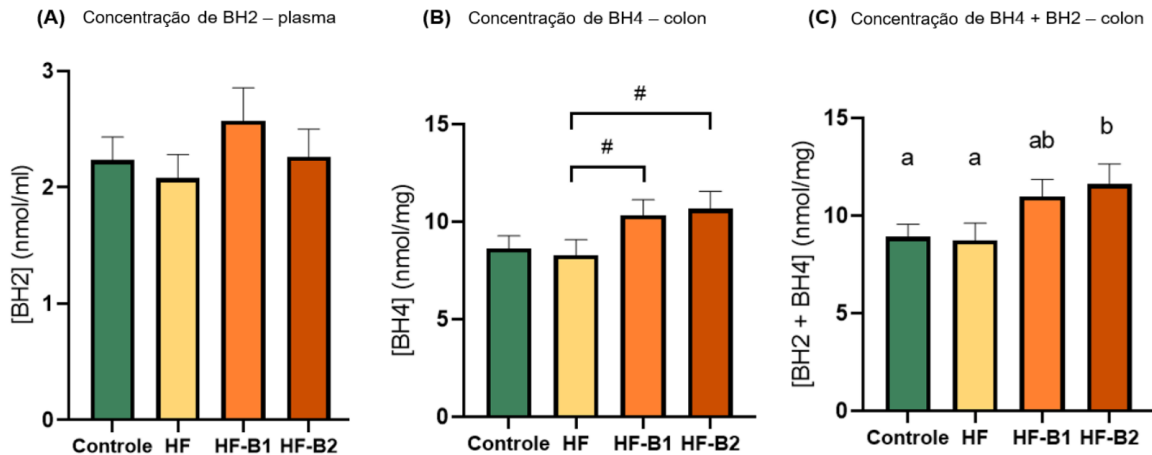
No plasma, a concentração de BH2 ([BH2]) não apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais (Figura 14.A). Entretanto, a concentração de BH4 no plasma não pôde ser medida de forma confiável, provavelmente devido à instabilidade oxidativa do composto.

No cólon (Figura 14.B), não foram observadas diferenças na concentração de BH4 entre os grupos C e HF. Entretanto, houve uma tendência de aumento da concentração de BH4 nos grupos HF-B1 e HF-B2 em relação ao grupo HF ($0,05 < p < 0,10$), sem atingir significância estatística.

Por outro lado, a análise do pool total BH2 + BH4, refletindo o total de pterinas ativas (Figura 14.C), revelou diferenças significativas entre os grupos. As concentrações observadas nos animais HF-B1 e HF-B2 foram significativamente maiores que as do grupo C e do grupo HF. Mais especificamente, o grupo HF-B2

apresentou o valor mais alto, estatisticamente diferente de C e HF ($p < 0,05$), enquanto o grupo HF-B1 mostrou um valor intermediário ($p = 0,08$).

Figura 14 – Efeitos dos diferentes tratamentos sobre as concentrações de BH2 e BH4 no plasma e no cólon.



(A) Concentração plasmática de BH2. (B) Concentração colônica de BH4. (C) Concentração total colônica de BH2 + BH4. Concentrações expressas em nmol/ml para o plasma e nmol/mg para o cólon. Dados expressos como média \pm EPM. # indica tendência estatística ($0,05 < p < 0,10$). (a,b): significativamente diferente entre os grupos; ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey e/ou testes t de Student para comparações par a par, ou testes não paramétricos equivalentes (Fonte: autora).

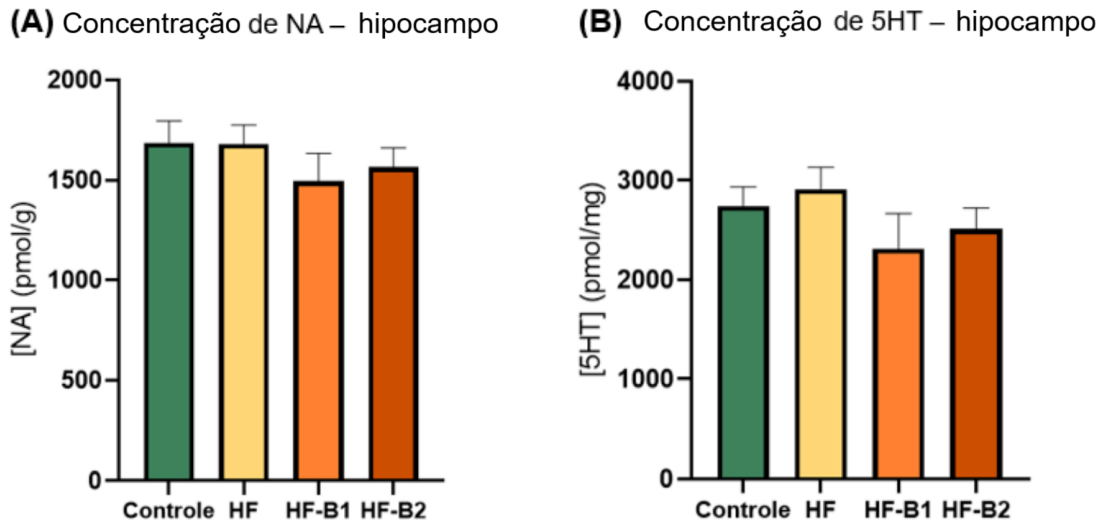
De modo geral, os resultados indicam que, embora o aumento isolado de BH4 no cólon seja apenas uma tendência estatística, a administração do tratamento B2 está associada a uma elevação significativa do pool total de BH2 + BH4 no cólon de camundongos HF.

6.1.7 Análise das monoaminas nos tecidos cerebrais

6.1.7.1 Hipocampo

A análise das monoaminas hipocámpais por HPLC-ECD não revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura 18). As concentrações de noradrenalina (NA) (Figura 18.A) foram comparáveis entre os animais do grupo C, do grupo HF e daqueles tratados com HF-B1 ou HF-B2. De forma semelhante, os níveis de serotonina (5-HT) (Figura 18.B) permaneceram estáveis, sem variações estatisticamente significativas entre os grupos.

Figura 15 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre as concentrações de monoaminas no hipocampo.

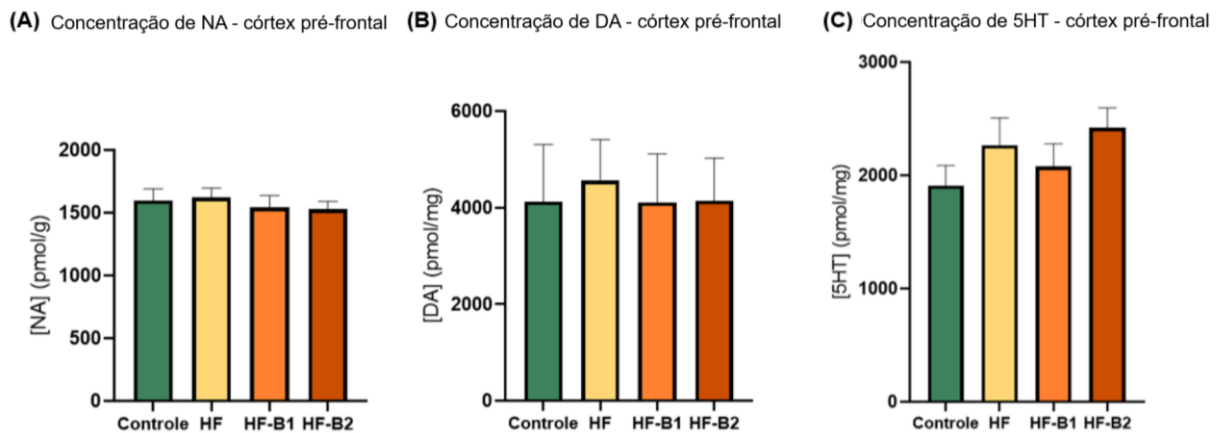


(A) Concentração de noradrenalina (NA, pmol/g). (B) Concentração de serotonina (5-HT, pmol/mg). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos. Resultados expressos como média \pm EPM (Fonte: autora)

6.1.7.2 Córtex pré-frontal

A análise das monoaminas no córtex pré-frontal não evidenciou diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura 19). Os níveis de noradrenalina (NA) (Figura 19.A) e dopamina (DA) (Figura 19.B) permaneceram comparáveis entre os grupos C, HF, HF-B1 e HF-B2. Da mesma forma, as concentrações de serotonina (5-HT) (Figura 19.C) não apresentaram variações estatisticamente significativas.

Figura 16 – Efeitos dos diferentes tratamentos sobre as concentrações de monoaminas no córtex pré-frontal.



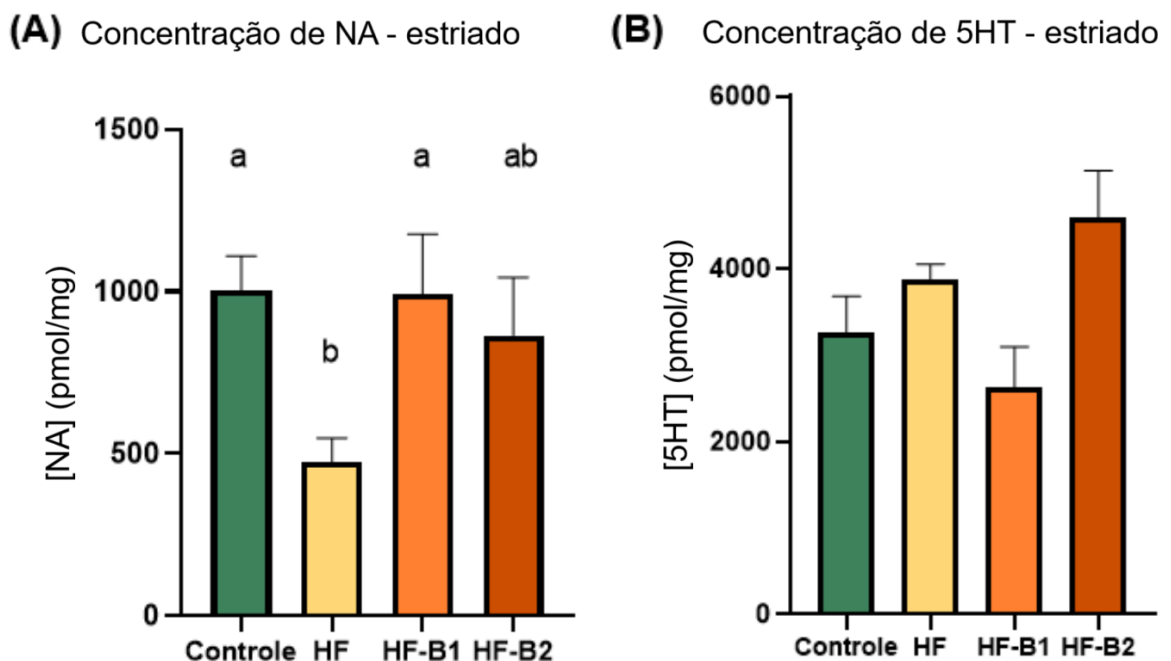
(A) Noradrenalina (NA, pmol/g). (B) Dopamina (DA, pmol/mg). (C) Serotonina (5-HT, pmol/mg). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos. Resultados expressos como média \pm EPM (Fonte: autora).

6.1.8.3 Estriado

A análise das monoaminas no estriado revelou diferenças significativas para a noradrenalina (NA) (Figura 17.A). Os animais submetidos à dieta HF apresentaram uma redução significativa de NA estriatal em comparação ao grupo C ($p = 0,003$). O tratamento HF-B1 restaurou os níveis de NA a valores comparáveis ao grupo C, enquanto HF-B2 apresentou uma tendência intermediária de aumento ($p < 0,05$).

Por outro lado, as concentrações de serotonina (5-HT) (Figura 17.B) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, embora tenha sido observada uma tendência de aumento no grupo HF-B2 em relação ao grupo C ($p = 0,07$).

Figura 17 – Efeitos dos diferentes tratamentos sobre as concentrações de monoaminas no estriado.



(A) Noradrenalina (NA, pmol/g). (B) Serotonina (5-HT, pmol/mg). Resultados expressos como média \pm EPM. (a,b): significativamente diferentes entre os grupos. ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey e/ou testes t de Student para comparações par a par, ou testes não paramétricos equivalentes (Fonte: autora).

6.2 DISCUSSÃO

Nesta pesquisa, exploramos o potencial da suplementação oral com bactérias produtoras de BH4 para combater as alterações ansioso-depressivas e metabólicas induzidas por uma dieta rica em gorduras em camundongos. Nossa abordagem consistiu em administrar e comparar duas cepas distintas, avaliando seus efeitos sobre o ganho de peso, a composição corporal, os comportamentos de tipo depressivo

e ansioso, bem como sobre as concentrações periféricas de BH4, BH2 e as concentrações centrais de monoaminas.

6.2.1 Peso e composição corporal

Nossos resultados demonstram que a administração das cepas produtoras de BH4, especialmente a cepa B2, induziu uma redução marcante da massa gorda e uma restauração notável da composição corporal, mesmo com a continuidade da dieta hiperlipídica (cf. Fig. 10 e Fig. 11). Esse fenótipo metabólico sugere uma modulação benéfica do microbiota intestinal, um efeito semelhante ao observado com outros probióticos pertencentes às Actinobactérias. Por exemplo, cepas como *Bifidobacterium breve* B-3 ou *B. pseudocatenulatum* demonstraram capacidade de atenuar o ganho de peso e a adiposidade em camundongos submetidos a dieta rica em gorduras (Kondo et al., 2010; Moya-Pérez et al., 2015), principalmente por modularem o metabolismo lipídico, reforçarem a integridade da barreira intestinal e reduzirem a inflamação de baixo grau.

Paralelamente, um estudo sobre o papel da BH4 no metabolismo energético mostrou que a deficiência em BH4 (modelo murino Hph-1) agrava a obesidade, a intolerância à glicose e prejudica a função termogênica do tecido adiposo marrom (BAT). Por outro lado, a restauração dos níveis de BH4 melhora esses parâmetros metabólicos ao ativar o BAT e regular o gasto energético (Oguri et al., 2017).

Assim, a convergência entre nossas observações experimentais e a literatura sugere um mecanismo duplo e potencialmente sinérgico para as cepas B1 e B2 testadas. Sua ação pode ocorrer por meio do aumento dos níveis de BH4, ativando o metabolismo energético do tecido adiposo marrom, e também por meio da modulação do microbiota e de suas funções imuno-metabólicas, similar a outras Actinobactérias. Essa dupla ação oferece uma explicação inovadora para a perda direcionada de massa gorda e para a melhora geral da composição corporal observadas em nosso modelo.

6.2.2 Testes comportamentais

Após a avaliação metabólica, foi essencial analisar as implicações comportamentais para compreender melhor o alcance dos efeitos observados. Nossos resultados comportamentais confirmam que a exposição prolongada a uma

dieta hiperlipídica (HF) induz em camundongos um fenótipo compatível com um estado depressivo e ansioso. Essas alterações se manifestaram, entre outros, por um aumento significativo no tempo de autoarrumação (grooming) no Splash Test (cf. Fig. 14), uma redução acentuada da preferência por sacarose (cf. Fig. 15), um aumento do tempo total de imobilidade e uma diminuição da latência até a imobilidade no teste de nado forçado (FST, cf. Fig. 16), além de uma piora no estado do pelagem (Coat State Test, cf. Fig. 17), refletindo um comprometimento dos comportamentos de autocuidado.

Esses parâmetros são marcadores confiáveis de um estado depressivo, caracterizado por anedonia, alteração nos mecanismos de recompensa e comportamento de resignação — comumente observados em modelos pré-clínicos de depressão (Gencturk e Unal, 2024). Esses resultados estão em concordância com a literatura que mostra que a obesidade induzida por dieta está associada a modificações comportamentais relacionadas à ansiedade e à depressão, frequentemente mediadas por inflamação e aumento do estresse oxidativo (Cardinal et al., 2021).

Nesse contexto, a administração das duas cepas bacterianas produtoras de BH4 mostrou efeitos distintos conforme o teste comportamental. A cepa B2 restaurou completamente a anedonia, medida pela preferência por sacarose, trazendo os níveis de resposta próximos aos do grupo controle (cf. Fig. 15). Esse efeito sugere uma ação positiva sobre os circuitos de recompensa, possivelmente via modulação das vias dopaminérgicas e serotoninérgicas, das quais a BH4 é cofator essencial. Já a cepa B1 não apresentou o mesmo benefício e até exacerbou a redução da preferência por sacarose.

Essa diferença entre cepas pode refletir variações na biodisponibilidade da BH4 produzida *in situ*, já que a dose bacteriana administrada não foi a mesma: a cepa B2 foi administrada a uma concentração mais alta (10^9 UFC/200 μ L) do que a cepa B1 (10^8 UFC/200 μ L). Além disso, as diferenças podem ser qualitativas — as cepas B1 e B2 podem ter distintas capacidades de produzir BH4 ou de colonizar o ambiente intestinal de forma duradoura. Esses aspectos deverão ser correlacionados com as análises do microbiota (em andamento nos quatro grupos experimentais).

O aumento do comportamento de grooming observado nos camundongos submetidos à dieta HF foi descrito como um indicador de ansiedade e de comportamento compensatório em contextos de desconforto fisiológico, refletindo possivelmente um estado de estresse (Deal et al., 2020). No entanto, alguns estudos associam a dieta obesogênica à redução do tempo de grooming, interpretada como sinal de negligência corporal ou apatia — sintomas centrais da depressão (Isingrini et al., 2010).

Em resumo, as variações de grooming observadas na literatura refletem a sensibilidade desse comportamento às condições experimentais (tipo de dieta, duração, linhagem, protocolo). Um aumento pode indicar uma resposta compensatória à ansiedade, enquanto uma redução pode sinalizar um estado depressivo mais profundo — ambos plausíveis como manifestações diferentes de um mesmo quadro tipo-depressivo.

Os resultados deste estudo mostram que os tratamentos com B1 e B2 atenuaram as alterações de grooming observadas nos grupos HF. Embora nenhum dos grupos tratados tenha alcançado uma normalização completa em relação ao controle, o grupo HF-B1 apresentou forte tendência à redução da duração do grooming ($p = 0,065$), sugerindo um efeito benéfico parcial. O grupo HF-B2 apresentou valores intermediários, não diferindo significativamente dos grupos HF ou controle (cf. Fig. 14). Seria interessante testar os efeitos de uma suplementação mais prolongada ou com dose bacteriana mais alta.

O Coat State Test revelou uma melhora significativa no estado do pelagem nos grupos tratados com B1 e B2 (cf. Fig. 13), indicando melhora dos comportamentos de autocuidado — frequentemente negligenciados em modelos murinos de depressão (Cardinal et al., 2021). Esse resultado reforça a hipótese de um efeito positivo das cepas sobre o bem-estar geral e a motivação.

No entanto, nem B1 nem B2 apresentaram efeito significativo no Forced Swim Test (FST, cf. Fig. 16), no qual todos os grupos HF — tratados ou não — mostraram maior tempo de imobilidade e menor latência à imobilidade em comparação aos controles, refletindo comportamento de resignação. Essa ausência de efeito sugere que os tratamentos não atuam sobre todos os domínios comportamentais afetados

pela dieta HF, ou que a duração da suplementação não foi suficiente para reverter completamente certos fenótipos depressivos.

Para compreender melhor esses resultados, foi necessário examinar as concentrações periféricas de pterinas e as concentrações centrais de monoaminas.

6.2.3 Metabolismo periférico das pterinas

Era essencial verificar se os tratamentos com B1 e B2 foram capazes de modular as concentrações periféricas (e cerebrais) de BH4 e BH2. Embora a concentração plasmática de BH2 tenha permanecido inalterada entre os grupos — e a BH4 plasmática não tenha podido ser dosada de forma confiável devido à sua instabilidade —, a análise do tecido colônico revelou modificações importantes. Observou-se uma tendência ao aumento da concentração de BH4 e um aumento significativo do pool total de pteridinas (BH2 + BH4) no grupo tratado com a cepa B2 (cf. Fig. 17). Esses resultados sugerem que as cepas administradas, especialmente B2, são capazes de aumentar localmente os níveis de BH4 no intestino, seja por produção direta, seja por influência nas vias de reciclagem ou síntese endógena.

Um ponto essencial para a interpretação desses resultados é a capacidade da BH4 periférica de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE). Estudos demonstraram que a BH4 administrada perifericamente pode aumentar as concentrações cerebrais de biopterinas. Fanet et al. (2020) mostraram que uma única injeção intraperitoneal (50 mg/kg) dobra os níveis cerebrais de BH4+BH2 três horas após a administração, resultando em maior liberação de dopamina no núcleo accumbens após estimulação anfetamínica.

Essa evidência de que a BH4 periférica pode atingir o cérebro e modular a neurotransmissão é crucial, pois apoia a hipótese de que a BH4 produzida exogenamente pelas bactérias neste estudo possa exercer efeitos tanto locais (no intestino) quanto centrais. As concentrações de BH4 e BH2 no cérebro ainda serão quantificadas nos quatro grupos experimentais.

Essa observação se insere em um contexto mais amplo, no qual o microbiota é reconhecido como regulador de metabólitos neuroativos e imunomoduladores. A disbiose induzida por uma dieta rica em gorduras pode alterar a produção de diversos metabólitos bacterianos envolvidos na comunicação intestino-cérebro (Cussotto et al.,

2018). Supõe-se que o aumento da BH4 no cólon possa contribuir para reduzir a inflamação sistêmica, conforme observado por Vancassel et al. (2022), que mostraram que a administração de BH4 em um modelo murino de neuroinflamação induzida por LPS aumenta os níveis cerebrais de BH4, restaura a dopamina estriatal e reduz citocinas pró-inflamatórias. Além disso, outras actinobactérias administradas por via oral já demonstraram efeito anti-inflamatório hepático (Oñate et al., 2023).

6.2.4 Monoaminas centrais

Para investigar o potencial da suplementação bacteriana produtora de BH4 sobre a síntese de monoaminas, os níveis de dopamina, serotonina e noradrenalina foram medidos em diferentes estruturas cerebrais envolvidas na regulação do humor.

Os resultados mostraram ausência geral de efeito no hipocampo e no córtex pré-frontal, mas alterações significativas no corpo estriado. A redução dos níveis de noradrenalina estriatal no grupo HF (cf. Fig. 20), em comparação ao controle, é particularmente relevante, dado o papel desse neurotransmissor na motivação, atenção e resposta ao estresse (Moret e Briley, 2011). A restauração completa desses níveis pelo tratamento B1 e parcial por B2 indica ação das duas cepas nesse sistema.

Por outro lado, a ausência de alterações significativas nos níveis de serotonina (5-HT) e dopamina (DA) no estriado, hipocampo e córtex pré-frontal (cf. Fig. 18 e Fig. 19) — medidas por HPLC — contrasta com alguns modelos de depressão (Cardinal et al., 2021). Essa ausência pode se dever a limitações metodológicas, uma vez que a HPLC mede apenas o conteúdo intracelular total e não reflete as dinâmicas de liberação e recaptção sinápticas.

Essas limitações são conhecidas na literatura, que recomenda técnicas alternativas como microdiálise in vivo ou fiber photometry para uma avaliação mais dinâmica da liberação de monoaminas (Bucher e Wightman, 2015).

Mesmo assim, nossos resultados sugerem que os efeitos comportamentais observados podem estar relacionados à modulação da via noradrenérgica — efetivamente alterada no estriado — e/ou a outros mecanismos, como inflamação, plasticidade sináptica e modulação do microbiota. A tendência ao aumento da 5-HT estriatal no grupo HF-B2, embora não significativa, merece investigação futura com

técnicas mais sensíveis, para detectar alterações sutis porém funcionalmente relevantes na neurotransmissão.

7 CONCLUSÕES

De modo geral, nossos resultados destacam o papel promissor de bactérias produtoras de BH4 na atenuação das alterações metabólicas e comportamentais induzidas por uma dieta hiperlipídica. A cepa B2, em particular, promove uma redução da massa gorda e uma restauração da composição corporal, provavelmente por meio de uma ação dupla que combina a modulação do microbiota e a restauração dos níveis de BH4, um cofator essencial do metabolismo energético. No plano comportamental, as melhorias observadas na preferência por sacarose e no estado da pelagem ressaltam a capacidade dessas cepas de agir sobre dimensões motivacionais e emocionais alteradas pela obesidade, embora alguns parâmetros, como a resignação comportamental no teste de natação forçada, permaneçam inalterados.

As análises bioquímicas fornecem um suporte mecanístico a essas observações: o aumento do pool colônico de pterinas pela cepa B2 sugere uma maior biodisponibilidade de BH4, com possíveis efeitos centrais via passagem pela barreira hematoencefálica — embora esse efeito ainda precise ser confirmado pela dosagem de pterinas em estruturas cerebrais. Além disso, a restauração dos níveis de noradrenalina estriatal pelas cepas B1 e B2 indica uma implicação da via noradrenérgica, conectando regulação metabólica, neurotransmissão e melhora comportamental. Esses resultados convergem para a ideia de que a BH4 microbiana pode constituir um mediador-chave do eixo intestino-cérebro e abrir caminho para estratégias inovadoras em psiquiatria nutricional e metabólica.

Este trabalho, entretanto, apresenta algumas limitações. As análises de inflamação (qPCR) e o sequenciamento 16S do microbiota ainda estão em andamento e serão essenciais para posicionar essas cepas no contexto dos Probióticos de Nova Geração (NGP). Do ponto de vista metodológico, a dosagem de monoaminas por HPLC, embora robusta, não reflete a dinâmica sináptica e deverá ser complementada por outras abordagens. Além disso, seria pertinente avaliar o potencial dessas cepas em sinergia com antidepressivos clássicos, a fim de determinar se tal combinação poderia reforçar a eficácia dos tratamentos existentes, especialmente em contextos

de comorbidade entre obesidade e transtornos depressivos. Também é importante mencionar que o uso exclusivo de animais machos limita a generalização dos resultados e ressalta a necessidade de estudos que incluam fêmeas.

Os resultados obtidos abrem caminho para a aplicação prática dessa abordagem no desenvolvimento de soluções úteis e inovadoras. Isso poderia ocorrer, por um lado, por meio da indústria de suplementos alimentares, com probióticos de nova geração destinados a apoiar a prevenção e o equilíbrio metabólico e emocional; e, por outro, por uma abordagem mais farmacêutica, voltada para o desenvolvimento de uma terapia inovadora que atenda às exigências clínicas e regulatórias. Essas duas vertentes, embora distintas, compartilham o mesmo objetivo: transformar observações de laboratório em aplicações concretas, acessíveis e benéficas para a saúde humana.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Depressive disorders*. In: *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. 5th ed., text rev. (DSM-5-TR). Washington, DC: American Psychiatric Association, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425787.x04_Depressive_Disorders. Acesso em: 1 set. 2025.
- BELIK, J. *et al.* Intestinal microbiota as a tetrahydrobiopterin exogenous source in hph-1 mice. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 39854, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep39854>.
- BELMAKER, R. H.; AGAM, G. Major depressive disorder. *New England Journal of Medicine*, v. 358, n. 1, p. 55-68, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMra073096>.
- BLAIR, J. A. *et al.* Tetrahydrobiopterin metabolism in depression. *The Lancet*, v. 324, n. 8395, p. 163, 1984. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(84\)91075-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(84)91075-4).
- BRASIL. Ministério da Saúde. Depressão. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/depressao>. Acesso em: 4 nov. 2025.
- BUCHER, E. S.; WIGHTMAN, R. M. Electrochemical analysis of neurotransmitters. *Annual Review of Analytical Chemistry*, v. 8, p. 239-261, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071114-040426>.
- CAPURON, L. *et al.* Depressive symptoms and metabolic syndrome: is inflammation the underlying link? *Biological Psychiatry*, v. 64, n. 10, p. 896-900, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.05.019>.
- CAPURON, L. *et al.* Chronic low-grade inflammation in elderly persons is associated with altered tryptophan and tyrosine metabolism: role in neuropsychiatric symptoms. *Biological Psychiatry*, v. 70, n. 2, p. 175-182, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.12.006>.
- CAPURON, L.; MILLER, A. H. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 130, n. 2, p. 226-238, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.01.014>.
- CAPURON, L.; LASSELIN, J.; CASTANON, N. Role of adiposity-driven inflammation in depressive morbidity. *Neuropsychopharmacology*, v. 42, n. 1, p. 115-128, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/npp.2016.123>.
- CARDINAL, P. *et al.* A new experimental design to study inflammation-related versus non-inflammation-related depression in mice. *Journal of Neuroinflammation*, v. 18, n. 1, p. 290, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02330-9>.
- CHANNON, K. M. Tetrahydrobiopterin and nitric oxide synthase recouplers. In: SCHMIDT, H. H. H. W.; GHEZZI, P.; CUADRADO, A. (org.). *Reactive Oxygen Species*:

Network Pharmacology and Therapeutic Applications. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 339-352. Disponível em: https://doi.org/10.1007/164_2020_390.

Chen XD, Li F, Zuo H, Zhu F. Trends in Prevalent Cases and Disability-Adjusted Life-Years of Depressive Disorders Worldwide: Findings From the Global Burden of Disease Study From 1990 to 2021. *Depress Anxiety*. 2025 Apr 24;2025:5553491. doi: 10.1155/da/5553491. PMID: 40313474; PMCID: PMC12045679.

CORRIGAN, M. *et al.* Inflammation in the pathogenesis of depression: a disorder of neuroimmune origin. *Neuronal Signaling*, v. 7, n. 2, p. NS20220054, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/NS20220054>.

CUSSOTTO, S. *et al.* The neuroendocrinology of the microbiota-gut-brain axis: a behavioural perspective. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 51, p. 80-101, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.04.002>.

DALILE, B. *et al.* The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 16, n. 8, p. 461-478, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0157-3>.

DANDUGA, R. C. S. R.; KOLA, P. K. Elevated plus maze for assessment of anxiety and memory in rodents. In: RAY, S. K. (org.). *Neuroprotection: Method and Protocols*. New York, NY: Springer US, 2024. p. 93-96. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3662-6_8.

DEAL, A. W. *et al.* High-fat diet negatively impacts both metabolic and behavioral health in outbred heterogeneous stock rats. *Physiological Genomics*, v. 52, n. 9, p. 379-390, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00018.2020>.

DELGADO, P. L. Depression: the case for a monoamine deficiency. *Journal of Clinical Psychiatry*, v. 61, suppl. 6, p. 7-11, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10775018/>.

DINEL, A.-L. *et al.* Cognitive and emotional alterations are related to hippocampal inflammation in a mouse model of metabolic syndrome. *PLoS ONE*, v. 6, n. 9, p. e24325, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024325>.

EMERY, C. F. *et al.* Gastric bypass surgery is associated with reduced inflammation and less depression: a preliminary investigation. *Obesity Surgery*, v. 17, n. 6, p. 759-763, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11695-007-9140-0>.

EUROPEAN COMMISSION. STATISTICAL OFFICE OF THE EUROPEAN UNION. *European Health Interview Survey (EHIS wave 3): methodological manual : 2018 edition*. Luxembourg: Publications Office, 2018. Disponível em: <https://data.europa.eu/doi/10.2785/020714>. Acesso em: 23 mar. 2025.

FANET, H. *Effets de l'administration de tétrahydrobioptérine en condition physiologique et pathologique : de la neurobiologie au comportement*. 2018. Thèse (Doctorat en Neurosciences) – Université de Bordeaux, Bordeaux, 2018.

FANET, H. *et al.* Tetrahydrobiopterin administration facilitates amphetamine induced dopamine release and motivation in mice. *Behavioural Brain Research*, v. 379, p.

112348, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112348>. Acesso em: 4 nov. 2025.

FANET, H. *et al.* Tetrahydrobiopterin (BH4) Pathway: From Metabolism to Neuropsychiatry. *Current Neuropharmacology*, v. 19, n. 5, p. 591–609, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1570159X18666200729103529>. Acesso em: 4 nov. 2025.

FARAJI, N. *et al.* Vagus nerve stimulation and gut microbiota interactions: A novel therapeutic avenue for neuropsychiatric disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 169, p. 105990, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2024.105990>. Acesso em: 4 nov. 2025.

FELGER, J. C. *et al.* Tyrosine metabolism during interferon-alpha administration: Association with fatigue and CSF dopamine concentrations. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 31, p. 153–160, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.10.010>. Acesso em: 4 nov. 2025.

FELGER, J. C. Role of Inflammation in Depression and Treatment Implications. In: MACALUSO, M.; PRESKORN, S. H. (ed.). *Antidepressants: From Biogenic Amines to New Mechanisms of Action*. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 255–286. Disponível em: https://doi.org/10.1007/164_2018_166. Acesso em: 4 nov. 2025.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>. Acesso em: 4 nov. 2025.

FRYE, M. A. Central tetrahydrobiopterin concentration in neurodevelopmental disorders. *Frontiers in Neuroscience*, [Preprint], 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnins.2010.00052>. Acesso em: 4 nov. 2025.

GENCTURK, S.; UNAL, G. Rodent tests of depression and anxiety: Construct validity and translational relevance. *Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience*, v. 24, n. 2, p. 191–224, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3758/s13415-024-01171-2>. Acesso em: 4 nov. 2025.

HARIRI, N.; THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition Research Reviews*, v. 23, n. 2, p. 270–299, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0954422410000168>. Acesso em: 4 nov. 2025.

HIRSCHFELD, R. M. A. History and Evolution of the Monoamine Hypothesis of Depression. *Journal of Clinical Psychiatry*, v. 61, p. 4–6, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10775017/>. Acesso em: 4 nov. 2025.

INSTITUTE FOR HEALTH METRICS AND EVALUATION (IHME). *Depressive disorders — Level 3 disease (GBD 2021)*. Disease, injury, and risk factsheets, 2024. Disponível em: <https://www.healthdata.org/research-analysis/diseases-injuries-risks/factsheets/2021-depressive-disorders-level-3-disease>. Acesso em: 12 mar. 2025.

ISINGRINI, E. *et al.* Association between Repeated Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) Procedures with a High Fat Diet: A Model of Fluoxetine Resistance in Mice.

PLOS ONE, v. 5, p. e10404, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010404>. Acesso em: 4 nov. 2025.

KAUFMAN, S. Phenylalanine Hydroxylation Cofactor in Phenylketonuria. *Science*, v. 128, n. 3337, p. 1506–1508, 1958. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.128.3337.1506>. Acesso em: 4 nov. 2025.

KHAN, A.; BHOJANI, M.; RAJPUT, M.; PONNURI, R. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for direct determination of tetrahydrobiopterin – an enzyme cofactor in human plasma. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, v. 2, n. 2, p. 838–701, abr./jun. 2013. ISSN 2277-5005. Disponível em: <http://www.ijpcsonline.com>. Acesso em: 4 nov. 2025.

KITAGAMI, T. *et al.* Mechanism of systemically injected interferon-alpha impeding monoamine biosynthesis in rats: role of nitric oxide as a signal crossing the blood–brain barrier. *Brain Research*, v. 978, n. 1, p. 104–114, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02776-8](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02776-8). Acesso em: 4 nov. 2025.

KONDO, S. *et al.* Antiobesity Effects of *Bifidobacterium breve* Strain B-3 Supplementation in a Mouse Model with High-Fat Diet-Induced Obesity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 74, n. 8, p. 1656–1661, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1271/bbb.100267>. Acesso em: 4 nov. 2025.

LAMERS, F. *et al.* Evidence for a differential role of HPA-axis function, inflammation and metabolic syndrome in melancholic versus atypical depression. *Molecular Psychiatry*, v. 18, n. 6, p. 692–699, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/mp.2012.144>. Acesso em: 4 nov. 2025.

LÉON, C.; DU ROSCOËT, E.; BECK, F. Prévalence des épisodes dépressifs en France chez les 18–85 ans: résultats du Baromètre santé 2021. *Santé Publique France*, 2022.

LIU, L. *et al.* Gut microbiota and its metabolites in depression: from pathogenesis to treatment. *eBioMedicine*, v. 90, p. 104527, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104527>. Acesso em: 4 nov. 2025.

MALHI, G. S.; MANN, J. J. Depression. *The Lancet*, v. 392, n. 10161, p. 2299–2312, 2018. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31948-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31948-2). Acesso em: 4 nov. 2025.

MILHEM, F. *et al.* Obesity-Resistant Mice on a High-Fat Diet Display a Distinct Phenotype Linked to Enhanced Lipid Metabolism. *Nutrients*, v. 16, n. 1, p. 171, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu16010171>. Acesso em: 4 nov. 2025.

MILLER, A. H.; RAISON, C. L. The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nature Reviews Immunology*, v. 16, n. 1, p. 22–34, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri.2015.5>. Acesso em: 4 nov. 2025.

MONCHAUX DE OLIVEIRA, C. *et al.* Prevention of Stress-Induced Depressive-like Behavior by Saffron Extract Is Associated with Modulation of Kynurenine Pathway and

Monoamine Neurotransmission. *Pharmaceutics*, v. 13, n. 12, p. 2155, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122155>. Acesso em: 4 nov. 2025.

MORET, C.; BRILEY, M. The importance of norepinephrine in depression. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, v. 7, supl. 1, p. 9–13, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/NDT.S19619>. Acesso em: 4 nov. 2025.

MOYA-PÉREZ, A.; NEEF, A.; SANZ, Y. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 Reduces Obesity-Associated Inflammation by Restoring the Lymphocyte Macrophage Balance and Gut Microbiota Structure in High-Fat Diet-Fed Mice. *PLOS ONE*, v. 10, n. 7, p. e0126976, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126976>. Acesso em: 4 nov. 2025.

NAÇÕES UNIDAS NO BRASIL. Brasil: afastamentos por problemas de saúde mental aumentam 134%. 17 abr. 2025. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/292926-brasil-afastamentos-por-problemas-de-saúde-mental-aumentam-134>. Acesso em: 4 nov. 2025.

NASSER, A. *et al.* Anxiety- and depression-like phenotype of hph-1 mice deficient in tetrahydrobiopterin. *Neuroscience Research*, v. 89, p. 44–53, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neures.2014.08.015>. Acesso em: 4 nov. 2025.

OGURI, Y. *et al.* Tetrahydrobiopterin activates brown adipose tissue and regulates systemic energy metabolism. *JCI Insight*, v. 2, n. 9, p. e91981, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.91981>. Acesso em: 4 nov. 2025.

OÑATE, F. P. *et al.* *Adlercreutzia equolifaciens* Is an Anti-Inflammatory Commensal Bacterium with Decreased Abundance in Gut Microbiota of Patients with Metabolic Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 15, p. 12232, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms241512232>. Acesso em: 4 nov. 2025.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ (OMS). *Principaux repères sur la dépression*. 2025. Disponível em: <https://www.who.int/fr/news-room/factsheets/detail/depression>. Acesso em: 30 ago. 2025.

O'RIORDAN, K. J. *et al.* The gut microbiota-immune-brain axis: Therapeutic implications. *Cell Reports Medicine*, v. 6, n. 3, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2025.101982>. Acesso em: 4 nov. 2025.

PAN, L. *et al.* GTP-cyclohydrolase deficiency responsive to sapropterin and 5-HTP supplementation: relief of treatment-refractory depression and suicidal behaviour. *BMJ Case Reports*, 2011, p. bcr0320113927. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bcr.03.2011.3927>. Acesso em: 4 nov. 2025.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, v. 266, n. 5604, p. 730–732, 1977. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/266730a0>. Acesso em: 4 nov. 2025.

RUSH, A. J. *et al.* Acute and Longer-Term Outcomes in Depressed Outpatients Requiring One or Several Treatment Steps: A STAR*D Report. *American Journal of Psychiatry*, v. 163, n. 11, p. 1905–1917, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1176/ajp.2006.163.11.1905>. Acesso em: 4 nov. 2025.

SPEAKMAN, J. R. Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. *International Journal of Obesity*, v. 43, n. 8, p. 1491–1492, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41366-019-0363-7>. Acesso em: 4 nov. 2025.

SUNESON, K. *et al.* Inflammatory Depression—Mechanisms and Non-Pharmacological Interventions. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 4, p. 1640, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22041640>. Acesso em: 4 nov. 2025.

TRENDER-GERHARD, I. *et al.* Autosomal-dominant GTPCH1-deficient DRD: clinical characteristics and long-term outcome of 34 patients. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, v. 80, n. 8, p. 839–845, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/jnnp.2008.155861>. Acesso em: 4 nov. 2025.

VANCASSEL, S.; CAPURON, L.; CASTANON, N. Brain Kynurenine and BH4 Pathways: Relevance to the Pathophysiology and Treatment of Inflammation-Driven Depressive Symptoms. *Frontiers in Neuroscience*, v. 12, p. 499, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00499>. Acesso em: 4 nov. 2025.

VANCASSEL, S. *et al.* Tetrahydrobiopterin modulates the behavioral neuroinflammatory response to an LPS challenge in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 105, p. 139–148, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2022.06.016>. Acesso em: 4 nov. 2025.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, v. 2, n. 2, p. 322–328, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>. Acesso em: 4 nov. 2025.

WERNER, E. R.; BLAU, N.; THÖNY, B. Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. *Biochemical Journal*, v. 438, n. 3, p. 397–414, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BJ20110293>. Acesso em: 4 nov. 2025.

WILLNER, P. *et al.* Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, v. 93, n. 3, p. 358–364, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00187257>. Acesso em: 4 nov. 2025.

XIE, B. *et al.* Effect of phototherapy on event-related potentials in patients with post-stroke depression through serum tetrahydrobiopterin level intervention: a clinical study. *BMC Psychiatry*, v. 25, n. 1, p. 6, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12888-024-06407-6>. Acesso em: 4 nov. 2025.

YALCIN, I.; AKSU, F.; BELZUNG, C. Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. *European Journal of Pharmacology*, v. 514, n. 2–3, p. 165–174, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.03.029>. Acesso em: 4 nov. 2025.

YALCIN, I.; BELZUNG, C.; SURGET, A. Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. *Behavioural Brain Research*, v. 193, n. 1, p. 140–143, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.04.021>. Acesso em: 4 nov. 2025.

APÊNDICE A

		Chegada dos animais	Aclimação	Início do protocolo	
Grupo	n animal	peso (g)	peso (g)	peso (g)	média
C	1	31,20	30	29,1	30,10
	2	34,8	33,3	32,6	33,57
	3	34,4	33,7	32,6	33,57
	4	33	31,6	31,6	32,07
	5	38	38,4	35,7	37,37
	6	32,8	32,7	32,3	32,60
	7	36,3	36,3	34,8	35,80
	8	35	34,8	32,9	34,23
	9	40	38,8	39	39,27
	10	36,1	36,3	36,1	36,17
	11	35	33,8	33,3	34,03
	12	38,8	37,7	36,8	37,77
	13	37,4	37,6	36,6	37,20
	14	39,3	38,4	37,7	38,47
	15	39,7	38,6	38,7	39,00
	16	34	33,7	32,6	33,43
HF	17	50	49,5	49	49,50
	18	45,5	44	43,7	44,40
	19	39,9	38,6	37,7	38,73
	20	45,5	46,1	47,3	46,30
	21	40	39,2	38,8	39,33
	22	45	42,9	39,7	42,53
	23	45,9	46,7	46,6	46,40
	24	43,5	44,4	41,5	43,13
	25	48,3	46,1	42,2	45,53
	26	37,4	37,1	37	37,17
	27	45,3	44,5	44,7	44,83
	28	49,3	48,3	47,9	48,50

	29	48,8	48	46,7	47,83
	30	43,8	42,3	40,5	42,20
	31	48,1	46,6	43,7	46,13
	32	37,7	36,4	34,1	36,07
HF-B1	33	46,7	43,1	38,5	42,77
	34	42,3	41,5	37,2	40,33
	35	45,7	41,8	40,9	42,80
	36	44,6	43,3	40	42,63
	37	46,5	44,4	43	44,63
	38	45,4	42,8	40	42,73
	39	46,5	43	40	43,17
	40	41	39,8	36,9	39,23
	41	37,2	36,8	36,5	36,83
	42	43,7	42,3	38,3	41,43
	43	45,3	44,3	41,8	43,80
	44	41,1	40,5	40	40,53
	45	44,1	43,4	39,6	42,37
	46	45,5	44,6	44,2	44,77
	47	45,1	45,3	45,6	45,33
48	47,6	48,3	48,8	48,23	
HF-B2	49	45,1	42	37,7	41,60
	50	41,6	39,7	35,6	38,97
	51	47,5	45,2	41,5	44,73
	52	49,3	48,7	48,8	48,93
	53	47	46,6	40,9	44,83
	54	37,7	36	34,2	35,97
	55	44	43,7	44,2	43,97
	56	44,2	40,9	36,3	40,47
	57	39,7	37,9	34,9	37,50
	58	44,7	42,3	38,5	41,83
	59	44,5	41,9	37,5	41,30
	60	44,1	41,2	37,5	40,93
	61	47	43,8	40,3	43,70
	62	44,6	43	37,8	41,80

	63	48,2	46,5	43,5	46,07
	64	42,5	40,5	37,7	40,23

- Animais cujo peso médio entre os 3 momentos considerados e inferior a 39,9 g, apresentam o peso médio destacado em cinza