

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

LOUISE TAVARES GARCIA PEREIRA

EFEITO DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL SOBRE A FUNÇÃO  
METABÓLICA E COGNITIVA EM CAMUNDONGOS

BRASÍLIA

2019

LOUISE TAVARES GARCIA PEREIRA

EFEITO DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL SOBRE A FUNÇÃO  
METABÓLICA E COGNITIVA EM CAMUNDONGOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Angélica Amorim Amato

Coorientadora: Profa. Dra. Andreza Fabro de Bem

BRASÍLIA

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

### Catálogo da Publicação

Ficha catalográfica

Louise Tavares Garcia Pereira

EFEITO DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL SOBRE A FUNÇÃO METABÓLICA E COGNITIVA EM CAMUNDONGOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2019.

**Banca Examinadora**

---

Profa. Dra. Angélica Amorim Amato – Universidade de Brasília

---

Profa. Dra. Maria de Fátima Borin – Universidade de Brasília

---

Profa. Dra. Cláudia Pinto Figueiredo - Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Profa. Dra. Djane Braz Duarte – Universidade de Brasília

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos e meu namorado, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiro à Deus por ter me dado saúde e força para superar às dificuldades.

Aos meus pais, Luís e Cristina pelo apoio e incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

Aos meus irmãos, Jonathan e Laise, pela convivência e amparo do dia-a-dia.

Ao meu namorado, Igor, pelo carinho, a paciência e pela sua capacidade de me trazer paz na correria da vida.

Aos meus colegas de laboratório, Bruna, Carol, Kenzo, Nadyellem, Fernanda, Sidney, Cinthia, Mariella, Natália, Simone, Ráiza, Kaian, Marielly, Amandda, Paula, Jorge, Wembley e as minhas amigas da graduação, Giselly, Larissa, Maíra e Rayane por me ajudar durante as dificuldades encontradas e por terem feito parte da minha formação.

À minha orientadora, Dra. Angélica Amorim, por ser uma excelente profissional, a qual me espelho.

A Profa. Dra. Andreza Fabro de Bem, pelos ensinamentos e dedicação que me auxiliaram durante esse percurso.

Aos alunos, professores e técnicos do Laboratório de Farmacologia Molecular, pelo aprendizado e pela experiência profissional proporcionada.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

*“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder entusiasmo. ”*

*(Winston Churchill)*

## RESUMO

PEREIRA, Louise Tavares Garcia. Efeito da Modulação da Microbiota Intestinal sobre a Função Metabólica e Cognitiva em camundongos. Brasília, 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

**Introdução:** Nos últimos anos, a microbiota intestinal tem sido cada vez mais ligada a uma série de doenças, incluindo a obesidade, doenças neurodegenerativas e doença hepática. Entre os vários modelos para estudar o efeito da microbiota intestinal sobre desfechos relacionados à obesidade, está a sua modulação pelo tratamento com antibióticos. Assim, nosso objetivo foi de investigar o efeito da modulação da microbiota intestinal sobre a função metabólica e cognitiva em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. **Métodos:** Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos com idade de seis semanas, alimentados com dieta controle (CD, n = 12) ou com dieta hiperlipídica (HFD, n = 12). Na idade de 7 semanas, eles foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos: para receber veículo ou antibióticos (AB), compondo 4 grupos experimentais assim descritos: CD, CD+AB, HFD e HFD+AB. Os antibióticos (ciprofloxacina 0,2 g L<sup>-1</sup> e vancomicina 0,5 g L<sup>-1</sup>) foram administrados da 10<sup>a</sup> a 15<sup>a</sup> semanas em água potável. Na 12<sup>a</sup> semana foi realizado o teste de tolerância à glicose. Os testes comportamentais - teste do campo aberto, teste de reconhecimento do objeto e suspensão pela cauda - foram realizados na 14<sup>a</sup> semana de vida e a eutanásia ocorreu na 15<sup>a</sup> semana. Paralelamente, camundongos ob/ob com 17 semanas de idade alimentados com dieta controle foram tratados com veículo (ob, n = 5) ou antibióticos (ob + AB, n = 5) e eutanasiados na 21<sup>a</sup> semana. Após a eutanásia, amostras de fígado foram armazenadas para avaliação da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real. A composição da microbiota fecal de todos os grupos experimentais de camundongos C57BL/6 (n = 5/grupo) foi analisada após 5 semanas de tratamento com os antibióticos. **Resultados:** Foi observado que a dieta hiperlipídica e o tratamento com antibióticos alteraram significativamente a composição da microbiota intestinal, determinada nas fezes. O grupo HFD apresentou aumento da representação do filo Firmicutes e diminuição dos Bacteroidetes em relação ao grupo CD, um perfil obesogênico. Os filos Firmicutes e Proteobacteria aumentaram expressivamente no grupo CD+AB em comparação com o grupo CD. No grupo HFD+AB, a representação do filo Firmicutes diminuiu e a de Proteobacteria aumentou em relação ao grupo HFD. A HFD aumentou significativamente o ganho de peso nos camundongos, tendo havido tendência de acentuação do ganho de peso induzido pela HFD nos animais tratados com antibióticos. Foi observado também que a HFD induziu déficit cognitivo e alterações da expressão gênica no fígado sugestivas de alteração no metabolismo de ácidos graxos. O tratamento com antibióticos também alterou a expressão de genes relacionados a oxidação de ácidos graxos e causou déficit cognitivo nos animais alimentados com CD, mas reverteu o declínio cognitivo nos animais alimentados com HFD. Não foi observado comportamento tipo depressivo em nenhum grupo experimental. Nos camundongos ob/ob, não foram observadas alterações significativas da expressão de genes relacionados ao metabolismo de ácidos graxos no fígado em resposta ao tratamento com antibióticos. **Conclusão:** Os resultados do presente estudo sugerem que alterações da composição da microbiota intestinal possam estar envolvidas na disfunção cognitiva e nas alterações do metabolismo lipídico induzidas pela dieta hiperlipídica. Mais estudos são necessários para esclarecer a extensão e os mecanismos subjacentes a esses efeitos e, assim, reafirmar que o papel da microbiota no controle do perfil metabólico periférico e em funções cerebrais como a cognição.

Palavras-chave: microbiota intestinal, função cognitiva, metabolismo lipídico.



## ABSTRACT

PEREIRA, Louise Tavares Garcia. Effect of Gut Microbiota Modulation on Metabolic and Cognitive Function in Mice. Brasília, 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

**Introduction:** In recent years, the gut microbiota has been increasingly linked to a number of diseases, including obesity, neurodegenerative diseases and liver disease. There are various models to study how gut microbiota composition impacts obesity-related outcomes, and one of them is modulation of gut microbiota by antibiotics. Our objective was therefore to investigate the effect of gut microbiota modulation on metabolic and cognitive outcomes in mice fed a high fat diet. **Methods:** Six-week old male C57BL/6 mice were fed a control diet (CD, n = 12) or a high fat diet (HFD, n = 12) were used. At the age of 7 weeks, they were randomized into 4 groups, assigned to receive vehicle or antibiotics (AB), composing 4 experimental groups as follows: CD, CD + AB, HFD and HFD + AB. Antibiotics (ciprofloxacin 0.2 g L<sup>-1</sup> and vancomycin 0.5 g L<sup>-1</sup>) were administered from the 10<sup>th</sup> to the 15<sup>th</sup> week in drinking water. In the 12<sup>th</sup> week, an oral glucose tolerance test was performed. Behavioral tests - open field test, object recognition test and tail suspension - were performed at the age of 14 weeks and at the 15<sup>th</sup> week mice were euthanized. At the same time, 17-week old ob/ob mice fed a control diet were treated with vehicle (ob, n = 5) or antibiotics (ob + AB, n = 5), and euthanized at week 21. After euthanasia, liver samples were stored for assessment of gene expression by quantitative real-time polymerase chain reaction. The fecal microbiota composition of all experimental groups of C57BL/6 mice (n = 5 / group) was analyzed after 5 weeks of antibiotic treatment. **Results:** High fat diet and antibiotic treatment significantly modified gut microbiota composition assessed in fecal samples. Mice fed a high group had increased representation of the Firmicutes phylum and decreased representation of Bacteroidetes, a obesogenic pattern, when compared with CD group. Firmicutes and Proteobacteria representation increased significantly in the CD + AB group compared with the CD group. In the HFD + AB group, there was decreased representation of the phylum Firmicutes and increased representation of Proteobacteria when compared with the HFD group. HFD significantly increased weight gain and there was a trend towards enhancement of this effect in mice fed a HFD and treated with antibiotics. We also observed that HFD induced a cognitive deficit and induced changes in hepatic gene expression suggestive of changes in fatty acid metabolism. Antibiotic treatment also caused cognitive deficit and changed the expression of fatty acid metabolism-related genes in mice fed a CD, but reversed the cognitive deficit induced by HFD. Depressive behavior was not observed in any experimental group. There were no significant changes in the expression of fatty acid metabolism-related genes in the liver of ob/ob mice treated with antibiotics. **Conclusions:** Our findings suggest that changes in gut microbiota composition may be involved in the cognitive dysfunction and in fatty acid metabolism changes related to high fat diet. Further studies are needed to clarify the extent and mechanisms underlying these effects and thus reaffirm the role of gut microbiota in controlling metabolic homeostasis and cognitive function.

Key words: intestinal microbiota, cognitive function, lipid metabolism.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Microbiota humana: início e formação em estágios e perturbações da vida.....	28
Figura 2 –	Obesidade induz mudança na composição da Microbiota humana: início e formação em estágios e perturbações da vida.....	30
Figura 3 -	Delineamento experimental 1 .....	36
Figura 4 -	Delineamento experimental 2 .....	37
Figura 5 -	Esquema dos Testes de Campo Aberto e Reconhecimento de Objeto.....	39
Figura 6 -	Avaliação da composição da microbiota intestinal no início (10 semanas) e final (15 semanas) do tratamento com antibióticos.....	48
Figura 7 –	Efeito da dieta e da modulação da microbiota intestinal com antibióticos sobre a massa corporal.....	50
Figura 8 –	Energia ingerida e Ingestão hídrica.....	51
Figura 9 –	Efeito da dieta e da modulação da microbiota intestinal com antibióticos sobre a tolerância à glicose na 12 <sup>a</sup> semana de vida .....	52
Figura 10 -	Testes Comportamentais.....	54
Figura 11 -	Expressão relativa do mRNA de PPAR- $\alpha$ , CPT1A, ACOX1 e TNF- $\alpha$ no fígado.....	56
Figura 12 –	Características histológicas do fígado de camundongos .....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição das dietas controle e hiperlipídica.....	34
Tabela 2 -	Sequência dos primers utilizados para determinação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real.....	44
Tabela 3 -	Parâmetros bioquímicos séricos.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Antibióticos
ACADM	Acil-coenzima A desidrogenase
ACOX1	Acil-coenzima A oxidase 1
CPT1A	Carnitina palmitoiltransferase 1a
CPT2	Carnitina palmitoiltransferase 2
CEUA-IB	Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília
CD	Dieta Controle
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
EHNA	Esteato-hepatite não alcoólica
FGNA	Fígado gorduroso não alcoólico
HFD	Dieta Hiperlipídica
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IMC	Índice de massa corporal
LPS	Lipopolissacarídeos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PPAR- $\alpha$	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa
16S rRNA	RNA ribossomal 16s
SLC25A20	Carnitina /acilcarnitina translocase
SNC	Sistema nervoso central
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
Tregs	Células T CD4 reguladoras
TTG	Teste de tolerância à glicose

## LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA

g	Gramas
L	Litro
g/L	Gramas por litro
kg/m <sup>3</sup>	Quilograma por metro cúbico
mL	Mililitro
μL	Micro litro
μL/L	Micro litro por Litro
nm	Nanomolar

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
2.1	OBESIDADE.....	18
2.2	OBESIDADE E INFLAMAÇÃO.....	21
2.3	OBESIDADE E AS ALTERAÇÕES NO SNC .....	23
2.4	DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA .....	24
2.5	MICROBIOTA INTESTINAL.....	25
2.6	MODELOS PARA ESTUDAR A MICROBIOTA INTESTINAL .....	30
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	32
3.6	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	33
4.2	MODELO ANIMAL E DIETA .....	33
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	34
4.3.1	Experimento 1 .....	35
4.3.2	Experimento 2 .....	37
4.4	TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (TTG) .....	37
4.5	TESTE DO CAMPO ABERTO .....	38
4.6	TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETO.....	38
4.7	TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA .....	39
4.8	DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS .....	40
4.9	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL PELA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA .....	40
4.10	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	41
4.11	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	41
4.11.1	Quantificação do RNA total e determinação da pureza da amostra .....	42
4.11.2	Tratamento do RNA com DNase I .....	42
4.11.3	Avaliação da integridade do RNA.....	43
4.11.4	Análise da expressão gênica (RNAm) por PCR em tempo real quantitativa .....	43
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	45
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>

5.1	EFEITO DO TRATAMENTO COM ANTIBIÓTICOS E DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE A COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL.....	46
5.2	EFEITO DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM ANTIBIÓTICOS SOBRE A MASSA CORPORAL, INGESTÃO DE ENERGIA E INGESTÃO HÍDRICA .....	49
5.3	EFEITO DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM ANTIBIÓTICOS SOBRE A TOLERÂNCIA À GLICOSE .....	51
5.4	EFEITO DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM ANTIBIÓTICOS SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	53
5.5	EFEITO DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM ANTIBIÓTICOS SOBRE FUNÇÃO COGNITIVA AVALIADA PELO TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETO .....	53
5.6	EFEITO DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM ANTIBIÓTICOS SOBRE EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À OXIDAÇÃO LIPÍDICA E PROCESSO INFLAMATÓRIO NO FÍGADO .....	55
5.7	EFEITO DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM ANTIBIÓTICOS SOBRE CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO FÍGADO.....	57
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>66</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A obesidade resulta de um balanço energético positivo, que ocorre quando a quantidade de energia ingerida excede a quantidade gasta (Sonnenburg & Bäckhed, 2016). A fisiopatologia da obesidade é muito mais complexa do que se pensava inicialmente. Trata-se de uma doença heterogênea, com muitos subtipos diferentes, e os mecanismos envolvidos em seu desenvolvimento incluem uma interação entre fatores genéticos e ambientais. A atual epidemia de obesidade é o resultado de um ambiente obesogênico (que inclui alimentos ricos em energia e redução de atividade física) em indivíduos com suscetibilidade genética para o seu desenvolvimento. A natureza heterogênea da doença dificulta o desenvolvimento de estratégias de tratamento efetivas. Além disso, diversas comorbidades estão associadas ao curso da obesidade, como as doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, doenças hepáticas e neoplásicas e, ainda, distúrbios do sistema nervoso central (SNC), como o dano cognitivo associado à doença de Alzheimer e a depressão (Hurt et al., 2011; Kivipelto, 2001).

Estudos epidemiológicos e experimentais recentes indicam que a obesidade e o consumo de uma dieta rica em gordura estão associados não somente a doenças metabólicas, mas também a danos estruturais e funcionais no SNC frequentemente associados a transtornos neuropsiquiátricos e às doenças neurodegenerativas (Vanhanen et al., 2006; Komulainen et al., 2007; Panza et al., 2011; Yates et al., 2012; Zhang & Tian, 2014). Para além da estreita relação com o comprometimento cognitivo, a obesidade e o consumo exagerado de dieta de padrão ocidental estão também associados à incidência da depressão (Carvalho et al., 2001).

A microbiota intestinal está intimamente envolvida em numerosos aspectos da fisiologia do hospedeiro, desde o estado nutricional até o comportamento e a resposta ao estresse. Além disso, ela pode ser causa central ou contribuinte de muitas doenças, afetando sistemas de órgãos próximos e distantes. Análises genômicas da microbiota intestinal permitiram a identificação abrangente da população de bactérias intestinais e revelaram que as mudanças nessas populações estão envolvidas na fisiopatologia de várias doenças. Diferenças na composição da microbiota intestinal entre pessoas eutróficas e obesas revelam que a microbiota, em pessoas obesas, é caracterizada pela redução da proporção relativa do filo Bacteroidetes e aumento proporcional nos membros do filo Firmicutes. Por outro lado, estudos clínicos demonstraram que a diminuição da relação Firmicutes/Bacteroidetes está diretamente relacionada à perda de peso (Sekirov et al., 2010; Minemura; Shimizu, 2015; Ley et al., 2006).



As dietas densamente calóricas, além de alterarem a composição da microbiota intestinal, induzem disfunção do intestino que, subsequentemente, resulta em inflamação da gordura visceral e desregulação metabólica sistêmica. Uma “microbiota obesogênica” pode alterar a função hepática estimulando a síntese de triglicerídeo hepático e modulando o metabolismo lipídico sistêmico, o que indiretamente afeta o armazenamento de ácidos graxos no fígado (Arslan, 2014).

Estudos recentes apontam que a modulação prejudicial da microbiota, decorrente da obesidade, pode contribuir para alterações inflamatórias no SNC e, por conseguinte, prejudicar o funcionamento neuronal. Uma característica comum das doenças metabólicas é a ativação crônica e de baixo grau do processo inflamatório, tanto em nível periférico como diretamente no SNC. Evidências recentes sugerem que a neuroinflamação é um mecanismo causal importante do declínio cognitivo característico das doenças neurodegenerativas. Assim, a inflamação sistêmica e central pode ser um elo entre a obesidade e as doenças neurodegenerativas, particularmente o declínio cognitivo. Este estado inflamatório, por sua vez, pode ser desencadeado por alterações na composição da microbiota intestinal (Solas et al., 2017).

Segundo Luczynski et al., 2016, a microbiota intestinal é também necessária para a responsividade normal ao estresse, comportamentos semelhantes à ansiedade, sociabilidade e cognição. Além disso, a microbiota mantém a homeostase do SNC regulando a função imunológica e a integridade da barreira hematoencefálica. A microbiota intestinal também influencia produção dos neurotransmissores, sinalização sináptica e neurotrófica e a neurogênese. Assim, estudos focados na compreensão do impacto da microbiota intestinal sobre o SNC, particularmente sobre as propriedades de aprendizado e memória, são de extrema relevância para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas no controle da obesidade e suas comorbidades.

No presente estudo, buscamos compreender o impacto da microbiota intestinal sobre a disfunção cognitiva induzida pela dieta hiperlipídica em camundongos, por meio da modulação da microbiota intestinal pela administração da microbiota. Secundariamente, avaliamos o perfil de expressão de genes relacionados ao metabolismo de ácidos graxos e resposta inflamatória em dois modelos de obesidade, a induzida pela dieta hiperlipídica e a monogênica (camundongos com deleção do gene que codifica a leptina).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 OBESIDADE

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2018), sobrepeso e obesidade são definidos como acúmulo anormal ou excessivo de gordura que apresenta risco à saúde. O índice de massa corporal (IMC) é um índice simples de peso para altura e é comumente usado para classificar o estado nutricional de adultos e definir a presença de sobrepeso e obesidade. Um indivíduo com excesso de peso tem IMC entre 25 e 29,9 kg/m<sup>2</sup> e uma pessoa é considerada obesa quando apresenta IMC maior ou igual a 30 kg/m<sup>2</sup>.

A obesidade é uma das doenças não transmissíveis mais graves e prevalentes no século XXI. Seu tratamento é complexo e centrado no paciente, com abordagens comportamental, farmacológica, nutricional e até mesmo cirúrgica. É também um fator de risco significativo para o aumento da morbidade e mortalidade, principalmente por doenças cardiovasculares e diabetes, mas também câncer e outras doenças agudas e crônicas, incluindo doenças hepáticas e do SNC, como o transtorno cognitivo e a depressão. Para a maioria dessas comorbidades, a perda de peso pode resultar em uma redução significativa destes riscos (Kushner, 2014; Pi-Sunyer, 2009).

Do ponto de vista fisiopatológico, a obesidade também é uma doença complexa, multifatorial, com origens genéticas, comportamentais, socioeconômicas e ambientais, que geralmente se manifesta na infância e adolescência. Sua origem é um intercâmbio genético e ambiental, no qual fatores ambientais ou comportamentais desempenham papel crítico, decorrente de um desequilíbrio entre o consumo de energia e o gasto (Hruby & Hu, 2015; Serra-Majem & Bautista-Castaño, 2013). A prevalência de obesidade duplicou em 73 países em todo o mundo e aumentou de forma constante em outros desde 1980, e os problemas de saúde resultantes do excesso de peso ou obesidade afetam agora mais de 2 bilhões de pessoas. Em 2015, 107,7 milhões de crianças e 603,7 milhões de adultos eram obesos em todo o mundo - 30% da população mundial. Em muitos países, as taxas de obesidade entre as crianças estão aumentando mais rapidamente do que as taxas de obesidade em adultos (Friedrich, 2017).

O aumento simultâneo da obesidade em quase todos os países parece ser impulsionado principalmente por mudanças no sistema alimentar global, que está produzindo alimentos mais processados e de fácil acesso à população. Dentro das populações, as interações entre fatores ambientais e individuais, incluindo a composição genética, explicam a variabilidade no

tamanho corporal entre os indivíduos. No entanto, mesmo com essa variação individual, a epidemia tem padrões previsíveis em subpopulações. Em países de baixa renda, a obesidade afeta principalmente adultos de meia-idade (especialmente mulheres) de ambientes urbanos ricos; enquanto nos países de alto rendimento afeta ambos os sexos e todas as idades, mas é desproporcionalmente maior nos grupos desfavorecidos (Swinburn et al., 2011).

O IMC e a adiposidade total são importantes determinantes da saúde metabólica em nível populacional. No entanto, a distribuição de gordura corporal e função do tecido adiposo comprometida, em vez de massa gorda total, melhor predizem as alterações metabólicas relacionadas com a obesidade, como a resistência à insulina. A disfunção do tecido adiposo é determinada por uma capacidade de hipertrofia dos adipócitos, metabolismo lipídico alterado, expansão do tecido adiposo prejudicada e inflamação local (Goossens, 2017).

A composição corporal resulta de uma interação dos constituintes dos vários compartimentos que compõem o organismo, os quais influenciam, de maneira específica, processos fisiológicos e mecanismos patológicos. A gordura subcutânea tem uma correlação muito menor com o risco cardiometabólico, quando comparada à gordura armazenada nos depósitos viscerais, que tem uma atividade metabólica menos favorável, caracterizada por secreção de quantidade maior de ácidos graxos livres, adipocinas, hormônios e fatores inflamatórios, que fluem para o fígado diretamente através da veia porta hepática. A gordura hepática tem uma associação mais próxima com a resistência à insulina. Embora a gordura hepática esteja associada à gordura visceral, seu efeito na resistência à insulina é independente do tecido adiposo visceral (Mazzocoli, 2016; Müller et al., 2012; Wang & Li, 2017).

Existem dois tipos de tecido adiposo, cuja função parece ser claramente diferenciada. O tecido adiposo branco armazena as reservas de energia como gordura, enquanto a função metabólica do tecido adiposo marrom é a oxidação lipídica para produzir calor. Um bom equilíbrio entre eles é importante para manter a homeostase energética. O tecido adiposo branco apresenta diferentes perfis metabólicos em seus diferentes locais. Embora a célula característica do tecido adiposo seja o adipócito, este não é o único tipo celular presente no tecido adiposo, nem o mais abundante. Outros tipos celulares incluem células-tronco, pré-adipócitos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células endoteliais. O equilíbrio entre esses diferentes tipos de células e seu perfil de expressão está intimamente relacionado à manutenção da homeostase energética (Ràfols, 2014).

O tecido adiposo branco é considerado o maior órgão de armazenamento de energia na forma de triglicérides, que são mobilizados através do processo de lipólise, para fornecer

substrato energético a outros órgãos e fornecer substratos ao fígado para gliconeogênese (glicerol) e síntese de lipoproteínas (ácidos graxos livres). Além do papel central do armazenamento de lipídeos, tem uma importante função endócrina secretando vários hormônios, notadamente leptina e adiponectina, e uma gama diversa de outros fatores proteicos. Esses vários sinais proteicos receberam, coletivamente, o nome de "adipocinas", que são altamente diversificadas em termos de estrutura proteica e função fisiológica. Eles incluem citocinas clássicas, fatores de crescimento e proteínas da via alternativa do sistema complemento. Há uma lista crescente de adipocinas envolvidas na inflamação, como fator de necrose tumoral-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), interleucina-10 (IL-10), fator de crescimento transformador- $\beta$ , fator de crescimento nervoso, e a produção destas proteínas pelo tecido adiposo está aumentada na obesidade (Large et al., 2004; Trayhurn & Wood, 2004).

A leptina é um sinal essencial dos adipócitos para o hipotálamo no controle do apetite e do balanço energético. A leptina é um hormônio pleiotrópico, cujas funções se estendem muito além do controle do apetite e do balanço de energia, englobando uma multiplicidade de ações, inclusive atuando como um sinal na reprodução e na imunidade. A adiponectina, um hormônio produzido exclusivamente pelos adipócitos, apresenta concentrações circulantes reduzidas na obesidade, em contraste com a maioria das adipocinas e da leptina em particular. Vários papéis são atribuídos à adiponectina, incluindo a modulação da sensibilidade à insulina e da função vascular, bem como uma ação anti-inflamatória (Trayhurn, 2007). A alimentação é um fator essencial na secreção de adipocinas, visto que a sua produção está diretamente relacionada com o tamanho do adipócito. Os lipídeos provenientes da dieta são armazenados no tecido adiposo em forma de triglicérides e quanto maior a sua concentração intracelular, maior o volume do adipócito e, conseqüentemente, a secreção de adipocinas, ocorrendo o inverso quando há pequenas quantidades de triglicérides armazenados (dos Santos & Torrent, 2016).

Deste modo, a obesidade é caracterizada por um aumento na massa adiposa, em consequência ao depósito do excesso de ácidos graxos nas células adiposas, devido a um balanço energético positivo mantido ao longo do tempo. Juntamente com o aumento do volume de tecido adiposo, há mudanças em sua fisiologia normal, levando-o a um tecido disfuncional. Tais alterações envolvem hipertrofia dos adipócitos e alterações no seu perfil secretório, depósito visceral de gordura, aumento da infiltração de células imunes, entre outros. A disfunção do tecido adiposo desempenha um papel fundamental na fisiopatologia das doenças metabólicas e cardiovasculares relacionadas à obesidade (Marcela, 2012).

## 2.2 OBESIDADE E INFLAMAÇÃO

O tecido adiposo é conhecido por secretar um grande número de proteínas que regulam o metabolismo, a ingestão de energia e o armazenamento de gordura. Contém também uma grande diversidade de células imunes que o tornam um órgão imunológico capaz de ligar o metabolismo e a imunidade. A função metabólica e imunitária dos adipócitos e da fração vascular do estroma do tecido adiposo (contendo pré-adipócitos, células endoteliais e imunitárias) está estreitamente ligada e o seu "microambiente" é frágil e facilmente perturbado. Alterações no estado imune do tecido adiposo afetam o conteúdo de citocinas e, conseqüentemente, o metabolismo dos adipócitos e a sensibilidade à insulina (Stolarczyk, 2017).

A obesidade é acompanhada por uma extensa remodelação do tecido adiposo, caracterizada principalmente por hipertrofia dos adipócitos. O crescimento extremo dos adipócitos é insuficiente para manter a normoxia tecidual. A hipóxia local se desenvolve e pode resultar em expressão alterada de adipocinas, recrutamento pró-inflamatório de macrófagos e resistência à insulina (Elias et al, 2012; Haynes et al., 2018).

O tecido adiposo contém a maioria dos tipos de células imunológicas e a obesidade aumenta seus números e ativação, particularmente de macrófagos. Outras células pró-inflamatórias encontradas no tecido adiposo incluem neutrófilos, células T CD4 Th1, células T CD8, células B, células dendríticas e mastócitos. No entanto, o tecido adiposo também contém células anti-inflamatórias cuja ação se opõe à de células imunes pró-inflamatórias responsáveis pela inflamação induzida pela obesidade nesse tecido. Estas células anti-inflamatórias incluem células T CD4 reguladoras (Tregs), células T CD4 Th2 e eosinófilos. Assim, a inflamação do tecido adiposo é moldada pela regulação da homeostase pró- e anti-inflamatória das células imunes, e a obesidade distorce esse equilíbrio em direção a um estado mais pró-inflamatório (Lee & Lee, 2014).

A resposta inflamatória induzida pela obesidade é uma inflamação crônica de baixo grau, iniciada pelo excesso de nutrientes nas células e sua incapacidade de armazená-los adequadamente. A sinalização inflamatória é ativada no início da expansão do tecido adiposo, com o rompimento da homeostase energética produzida por um balanço energético positivo e, no curso da obesidade crônica, distorce permanentemente o sistema imunológico para um fenótipo pró-inflamatório. A resposta inicial é adaptativa para aliviar a pressão anabólica produzida pela obesidade. No entanto, ao longo do tempo, essa resposta adaptativa se

transforma em uma resposta mal-adaptativa e a natureza sustentada da inflamação indica uma incapacidade de resolver a resposta inicial (Gregor & Hotamisligil, 2011; Saltiel & Olefsky, 2017).

A inflamação crônica no tecido adiposo constitui um importante elo entre a obesidade e suas sequelas fisiopatológicas. Com a expansão do tecido adiposo, sobretudo o visceral, inicia-se processo inflamatório local que atinge tecidos à distância e resulta em disfunção de diversos processos fisiológicos associados à regulação da homeostase metabólica. São observadas, entre outras alterações, diminuição da função da barreira intestinal, aumento do acúmulo hepático de gordura e disfunção metabólica. A ativação das vias inflamatórias interfere no metabolismo e interrompe a sinalização adequada da insulina, levando ao aumento do acúmulo lipídico ectópico e inflamação sistêmica (Reilly & Saltier., 2017).

A inflamação sistêmica e o excesso de ácidos graxos livres circulantes causados pela disfunção do tecido adiposo na obesidade podem afetar estruturas cerebrais. Citocinas circulantes, ácidos graxos livres e células imunes chegam ao cérebro, especificamente ao hipotálamo, e iniciam a inflamação local, incluindo a proliferação microglial. Outras regiões cerebrais, como o hipocampo e a amígdala, também são afetadas pela neuroinflamação induzida pela obesidade. A disfunção hipocampal, com consequente comprometimento das funções cognitivas e o descontrole dos centros de processamento de recompensa, são manifestações neurológicas decorrentes da obesidade. Assim, a inflamação central na obesidade leva não apenas ao rompimento dos sinais de saciedade hipotalâmicos e à perpetuação de comer em excesso, mas também a resultados negativos na cognição (Miller & Spencer, 2014).

Mais recentemente, o papel das alterações da microbiota intestinal vem sendo reconhecido como um elo adicional para explicar a associação entre a obesidade e as desordens do SNC (comprometimento cognitivo e alterações de humor e comportamento social). As alterações da microbiota intestinal induzidas pela dieta obesogênica podem contribuir para a neuroinflamação e desregulação do sistema neuroendócrino associado à obesidade e, assim, comprometer a função do SNC. Essa hipótese foi confirmada até certo ponto em modelos experimentais, que investigaram a efetividade de alguns probióticos ou compostos que alteram a microbiota intestinal, tanto atenuando a obesidade, quanto os transtornos neurológicos associados (Agustí et al., 2018).

### 2.3 OBESIDADE E AS ALTERAÇÕES NO SNC

Evidências epidemiológicas e experimentais indicam que a obesidade e o consumo exagerado da dieta ocidental podem causar danos estruturais e funcionais no SNC, frequentemente associados a transtornos neurológicos incluindo, a depressão, o transtorno cognitivo e a doença de Alzheimer (Komulainen et al., 2007; Panza et al., 2011; Kaidanovich-Beilin & McIntyre, 2012). Estudos clínicos comprovam que a obesidade na meia idade é um fator de risco independente para o desenvolvimento de transtorno cognitivo e da doença de Alzheimer no envelhecimento (Kivipelto, 2001; Tolppanen et al., 2014).

O consumo excessivo de dieta hiperlipídica é associado a alterações de memória e aprendizado em crianças (Baym et al., 2014), adultos (Gibson & Jeanes, 2013) e em idosos (Kanoski & Davidson, 2011), indicando que o consumo da “dieta ocidental” impacta a cognição durante todas as etapas da vida. Diversos estudos experimentais em roedores confirmaram que o alto consumo de dieta rica em lipídeos induz déficit cognitivo, especialmente em testes de memória dependente do hipocampo (Kaidanovich-Beilin & McIntyre, 2012; Beilharz & Morris, 2014; Attuquayefio et al., 2017).

Estudos de coorte indicam a associação bidirecional entre a obesidade e a depressão. Em um estudo de base populacional de adultos jovens, mulheres obesas na infância apresentaram maior frequência de sintomas depressivos na idade adulta, e a gravidade desses sintomas aumentou de acordo com a exposição à síndrome metabólica ao longo da vida (Pulkki-Raback et al., 2009). Ao tratar farmacologicamente pacientes idosos para a depressão, o estudo de Mulvahill et al. (2017) demonstrou que, além de os indivíduos obesos demonstrarem maior gravidade dos sintomas e cronicidade da depressão, necessitaram de tempo mais prolongado de tratamento para a remissão dos sintomas. É de especial interesse investigar esta associação em populações idosas, uma vez que ambas as condições têm sua frequência aumentada pela idade e produzem consequências adversas na qualidade de vida. Além disso, há a hipótese de que um subtipo vascular de depressão pode existir, o qual está etiológicamente ligado a alterações metabólicas através de doenças vasculares (Marazziti et al., 2014). Se esta associação for verdadeiramente causal, a redução da prevalência da obesidade poderia levar a um declínio da prevalência e incidência de depressão na vida adulta.

A inter-relação entre a obesidade e o desenvolvimento de prejuízo cognitivo tem sido demonstrada em estudos epidemiológicos e experimentais. De forma específica, os dados obtidos reportam a relação entre a presença de fatores de risco vasculares, como hipercolesterolemia, hipertensão e obesidade durante a “meia-idade” e o desenvolvimento de

comprometimento cognitivo em idades mais avançadas (Kivipelto et al., 2001, 2005; Peila et al., 2001; Solomon et al., 2009; Tolppanen et al., 2012).

## **2.4 DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA**

A DHGNA é definida como a presença de esteatose hepática na ausência de causa secundária para o acúmulo de gordura hepática, como a hepatite viral crônica, o uso de medicamentos e outras doenças crônicas do fígado, tais como como hepatite autoimune ou consumo significativo de álcool. A DHGNA é categorizada histologicamente em fígado gorduroso não alcoólico (FGNA) e esteato-hepatite não alcoólica (EHNA). A FGNA é definida como a presença de esteatose hepática sem evidência de lesão hepatocelular na forma de balonismo dos hepatócitos. O EHNA é definido como a presença de esteatose hepática e inflamação com lesão nos hepatócitos (balonismo), com ou sem fibrose (Chalasani et al., 2012).

A DHGNA é uma condição multifatorial e os mecanismos subjacentes ao seu desenvolvimento não são completamente compreendidos. Vários fatores genéticos, metabólicos, inflamatórios, nutricionais e ambientais contribuem para sua patogênese (Abu-Shanab & Quigley, 2010). A DHGNA é atualmente a doença hepática crônica mais comum nos países desenvolvidos, devido à epidemia de obesidade. A DHGNA aumenta a morbidade e a mortalidade relacionadas ao fígado e, muitas vezes, aumenta o risco de outras comorbidades, como diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares (Pappachan et al., 2017).

Uma meta-análise realizada por Younossi et al. (2016) estimou que cerca de 25% da população adulta no mundo possui DHGNA. Embora a DHGNA seja altamente prevalente em todos os continentes, as maiores taxas de prevalência foram reportadas na América do Sul (31%) e no Oriente Médio (32%), enquanto a menor prevalência foi relatada na África (14%).

A resistência à insulina é a característica fisiopatológica da DHGNA. O aumento do fluxo de ácidos graxos livres do tecido adiposo para órgãos não-adiposos, um resultado do metabolismo anormal da gordura, leva ao acúmulo hepático de triglicérides e contribui para o comprometimento do metabolismo da glicose e da sensibilidade à insulina no músculo e no fígado (Bugianesi et al., 2005). Os ácidos graxos livres provenientes da lipólise na gordura visceral, liberados em grande quantidade na circulação portal, têm papel definitivo na gênese da resistência tecidual à ação insulínica, tanto em nível hepático como periférico (Ribeiro Filho et al, 2006).



O receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa (PPAR- $\alpha$ ) é um fator de transcrição ativado por ligante envolvido na regulação de uma variedade de processos, variando de inflamação e imunidade ao metabolismo de nutrientes e homeostase de energia. Além disso, o PPAR- $\alpha$  liga-se e é ativado por numerosos ácidos graxos e compostos derivados de ácidos graxos. O PPAR- $\alpha$  governa processos biológicos alterando a expressão de um grande número de genes alvo. A capacidade de estimular a oxidação dos ácidos graxos pela  $\beta$ -oxidação e suprimir a inflamação hepática levou à exploração de agonistas deste receptor como uma opção terapêutica para a DHGNA e, especificamente, para a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) (Rakhshandehroo et al., 2010).

O PPAR- $\alpha$  é um dos principais reguladores dos genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos, que ocorre nas mitocôndrias, peroxissomos e microsomas do fígado. A regulação dos componentes individuais da  $\beta$ -oxidação depende da sua função e posição na cascata de  $\beta$ -oxidação. Proteínas envolvidas no transporte de ácidos graxos para as mitocôndrias [carnitina palmitoiltransferase 1a (CPT1A), carnitina palmitoiltransferase 2 (CPT2) e carnitina/acilcarnitina translocase (SLC25A20)] e ativação de ácidos graxos [acil-coenzima A desidrogenase (ACADM) e Acil-coenzima A oxidase 1 (ACOX1)] estão entre os alvos diretos (McMullen et al., 2014).

Ao aumentar a expressão desses genes, os ligantes do PPAR- $\alpha$  ativam significativamente a oxidação hepática de ácidos graxos, enquanto a inativação da expressão do gene que codifica o PPAR- $\alpha$  resulta em acúmulo maciço de lipídios no fígado, hipocetonemia grave, hipoglicemia, hipotermia e aumento da concentração plasmática de ácido graxo livre. O PPAR- $\alpha$  é um fator chave no controle da adaptação metabólica ao aumento dos ácidos graxos. Ao aumentar a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e fornecer energia para a célula, evita o acúmulo e a toxicidade celular dos lipídios. Além disso, estimula a captação celular de ácidos graxos, aumentando a expressão da proteína de transporte de ácidos graxos e da translocase de ácidos graxos (Monsalve et al., 2013).

## 2.5 MICROBIOTA INTESTINAL

O intestino humano é colonizado por 100 trilhões de bactérias, que constituem a microbiota intestinal. Esta microbiota é específica para cada indivíduo, apesar da existência de várias espécies bacterianas compartilhadas pela maioria dos adultos. Estudos demonstraram que roedores e humanos magros e com excesso de peso podem apresentar diferenças na composição

de sua microbiota intestinal. Em humanos, as diferenças na composição da microbiota, genes funcionais e atividades metabólicas observadas entre indivíduos obesos e magros sugerem uma contribuição da microbiota intestinal para esses fenótipos. Nos últimos anos, dados de diferentes fontes estabeleceram umnexo causal entre a microbiota intestinal e a obesidade/resistência à insulina (Saad et al., 2016; Gérard, 2016).

Muitos estudos apoiam a visão de que uma mudança na atividade metabólica da microbiota intestinal pode contribuir para o desenvolvimento da obesidade, todavia nenhum grupo identificável de microrganismos intestinais foi estabelecido como agente causal da obesidade. Evidências convergentes sugerem uma relação complexa entre o microbioma intestinal, as vias metabólicas do hospedeiro, o sistema imunológico, o tecido adiposo, os fatores genéticos, comportamentos e dieta do hospedeiro. A estreita interação entre a dieta, a microbiota intestinal e o hospedeiro pode ser a base da antiga relação simbiótica entre os microrganismos e os seres humanos (Sanmiguel et al., 2015).

Embora as relações de causa e efeito da microbiota intestinal com a obesidade ainda não estejam claras, a microbiota intestinal pode participar do metabolismo energético através da coleta de energia a partir da dieta, regulação do armazenamento de gordura, regulação da lipogênese ou regulação da oxidação de ácidos graxos. Além disso, diferenças na composição da microbiota intestinal em humanos e camundongos obesos sugerem que diferentes microrganismos ou comunidades podem influenciar o peso corporal. A disbiose (composição microbiana alterada do intestino) com outros fatores genéticos e ambientais predisponentes, pode contribuir para os distúrbios metabólicos do hospedeiro, resultando em muitas doenças (Gérard, 2016; Harakeh et al., 2016).

A comparação das bibliotecas de clones de 16S rDNA do intestino grosso em espécies de mamíferos confirma que a distribuição dos grupos filogenéticos é semelhante, independentemente da espécie hospedeira, com pequenas diferenças relacionadas aos grupos de organismos (Wang et al., 2003).

A microbiota intestinal humana é dominada por cinco filos bacterianos (Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia) e um Archaea (Euryarchaeota). Os grupos bacterianos menos prevalentes estão distribuídos entre Cyanobacteria, Fusobacteria, Lentisphaerae, Spirochaetes e TM7. Os três filos mais predominantes no intestino humano são Actinobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes (Tremaroli & Fredrik Bäckhed, 2012).

O filo Firmicutes é um filo grande abrangendo 274 gêneros de bactérias predominantemente Gram-positivas. Firmicutes são comuns no intestino de camundongos e humanos e contém gêneros relevantes, incluindo *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* (várias cepas dos quais são probióticos) e os produtores de butirato *Eubacterium*, *Faecalibacterium* e *Roseburia*. Em Bacteroidetes, *Bacteroides*, *Prevotella* e *Xylanibacter* degradam uma variedade de glicanos complexos. O filo Actinobacteria consiste de bactérias Gram-positivas, inclui *Collinsella* e *Bifidobacterium* (que contém cepas probióticas). Proteobactérias comuns são *Escherichia* (da família Enterobacteriaceae) e *Desulfovibrio* (que contém bactérias redutoras de sulfato). A Verrucomicrobia foi recentemente descoberta e inclui *Akkermansia* (que são especializados na degradação de muco) (Tremaroli & Fredrik Bäckhed, 2012; Greiner & Bäckhed, 2011).

A microbiota intestinal humana sofre maturação desde o nascimento até a idade adulta e é ainda mais alterada com o envelhecimento (Figura 1). Em adultos, os Bacteroidetes e Firmicutes são os filos predominantes, Actinobacteria representa um filo importante encontrado na microbiota fecal infantil, muito acima de Firmicutes e Bacteroidetes. Na microbiota de animais e humanos obesos há uma razão aumentada de Firmicutes para Bacteroidetes (o padrão de obesidade). A relação Firmicutes / Bacteroidetes sofre um aumento desde o nascimento até a idade adulta e é alterada com a idade avançada. Pode estar ligada a mudanças gerais nos perfis bacterianos em diferentes fases da vida (Mariat et al., 2009; Bell, 2015).

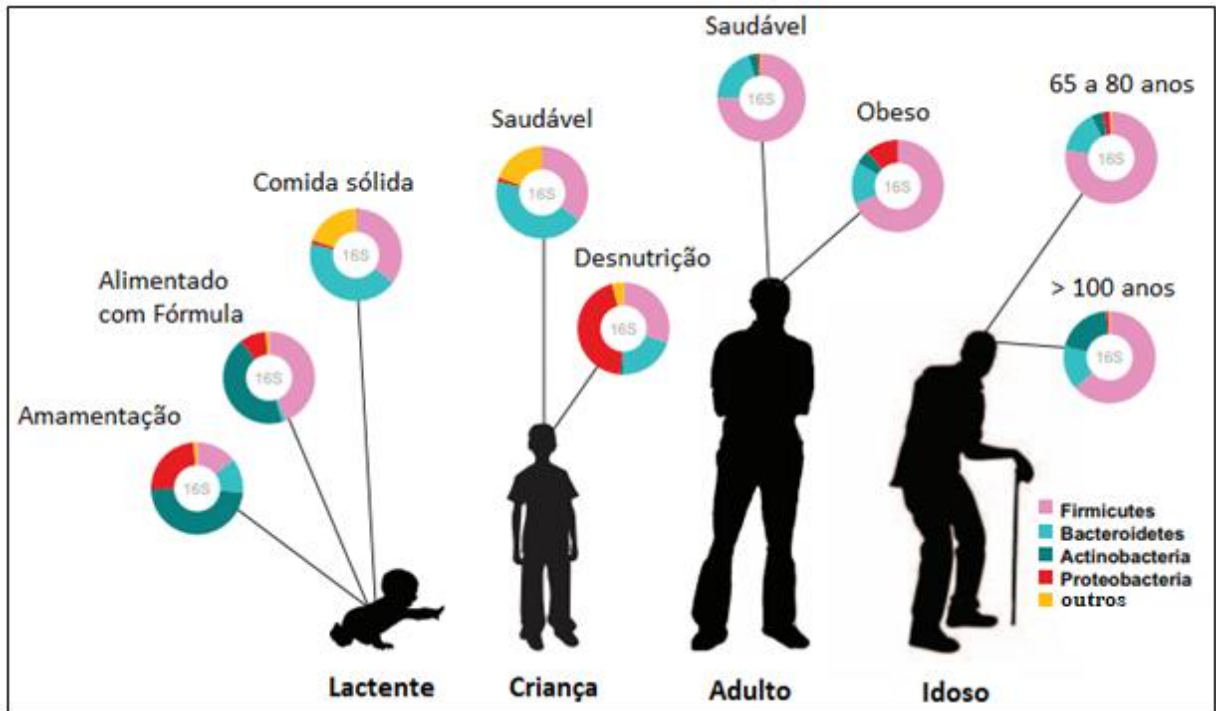


Figura 1 - Microbiota humana: início e formação em estágios e perturbações da vida. Medido por RNA 16S. Fonte: Adaptada de Ottman et al., 2012.

Dois mecanismos principais parecem resultar em mudanças na composição de espécies da microbiota intestinal. Primeiro, diferentes espécies microbianas variam em suas capacidades, determinadas por seus genomas, para utilizar substratos de origem alimentar e hospedeira. Espera-se que isto determine o resultado da competição por substratos disponíveis no intestino grosso, com certas espécies favorecidas em detrimento de outras quando substratos particulares estão em maior abundância. Em segundo lugar, diferentes espécies podem variar em sua tolerância a uma ampla gama de fatores no ambiente intestinal, tais como pH alto ou baixo, altas concentrações de sais biliares ou baixas concentrações de micronutrientes que tendem a limitar o crescimento microbiano (Flint et al., 2015).

A microbiota intestinal pode contribuir para a inflamação de baixo grau através de uma série de interações moleculares com o hospedeiro e, portanto, pode indiretamente participar do aparecimento da obesidade e doenças metabólicas. Acredita-se que os lipopolissacarídeos (LPS), também denominados endotoxinas, derivados da membrana celular externa de bactérias Gram-negativas, iniciem os processos relacionados à inflamação através do aumento da permeabilidade da barreira intestinal induzida pela disbiose (Boulangé et al., 2016).

Evidências atuais sugerem que uma composição microbiana diferente pode influenciar o neurodesenvolvimento, comportamentos exploratórios e comunicativos e o desempenho cognitivo e, por sua vez, o sistema nervoso pode influenciar indiretamente a composição da

microbiota entérica, por múltiplos mecanismos, incluindo vias endócrinas e neurócrinas. Esta hipótese é apoiada por várias evidências mostrando mecanismos mútuos, que envolvem o nervo vago, o sistema imunológico, a modulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal e os metabólitos derivados das bactérias, como os ácidos graxos de cadeia curta. Isso contribui significativamente para estabelecer o conceito bem aceito do eixo microbiota-intestino-cérebro. (Russo et al., 2018; Carlson et al., 2018).

Ainda é incerto como ocorre a comunicação bidirecional do eixo microbiota-intestino-cérebro. Acredita-se que o aumento da permeabilidade intestinal tenha um papel chave neste processo, haja vista que o afrouxamento da conexão entre as células epiteliais do trato gastrointestinal promove a troca de substâncias entre o lúmen e a região abdominal (bactérias e produtos do metabolismo das bactérias). Algumas cepas de bactérias e seus metabólitos podem ter como alvo o cérebro diretamente através de estimulação vagal ou indiretamente através de mecanismos imunológicos neuroendócrinos (Lach et al., 2017; Torres-Fuentes et al., 2017).

Essencial para o desenvolvimento e função do cérebro, a barreira hematoencefálica (BHE) é uma barreira fisiológica que controla a passagem de moléculas entre o parênquima cerebral e o sangue e, ao fazê-lo, permite o funcionamento adequado dos neurônios. Também garante a homeostase do sistema nervoso central (SNC). Braniste et al., (2014) demonstrou que o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, observado em camundongos sem germes desde o início da vida, foi mantido na idade adulta. Esse aumento da permeabilidade poderia ser anulado se os camundongos fossem expostos ao transplante fecal de material de doadores saudáveis. As proteínas de junção estreita, que são importantes para a permeabilidade da barreira hematoencefálica, sofreram alterações estruturais e tiveram redução de sua expressão em camundongos sem germes. Em conjunto, estes dados demonstram que as alterações na microbiota nativa podem ter consequências de longo alcance para a função de barreira hematoencefálica no decorrer da vida.

Por meio da integração de vias de comunicação, o eixo microbiota-intestino-cérebro controla processos fisiológicos centrais, como neurotransmissão, neurogênese, neuroinflamação e sinalização neuroendócrina. Todos estes processos estão implicados em respostas relacionadas ao estresse e na disfunção metabólica mediada pela obesidade. A desregulação da microbiota intestinal leva subsequentemente a alterações em diversos processos fisiológicos do SNC contribuindo para o desenvolvimento de distúrbios relacionados ao estresse, incluindo ansiedade, depressão e síndrome do intestino irritável e possivelmente o dano cognitivo (Foster et al., 2017).

Como a microbiota intestinal parece contribuir para quase todos os aspectos do crescimento e desenvolvimento do hospedeiro, não é de surpreender que um enorme conjunto de doenças e disfunções tenha sido associado a um desequilíbrio em qualquer composição, número ou habitat da microbiota intestinal (Figura 2) (Sekirov et al., 2010).

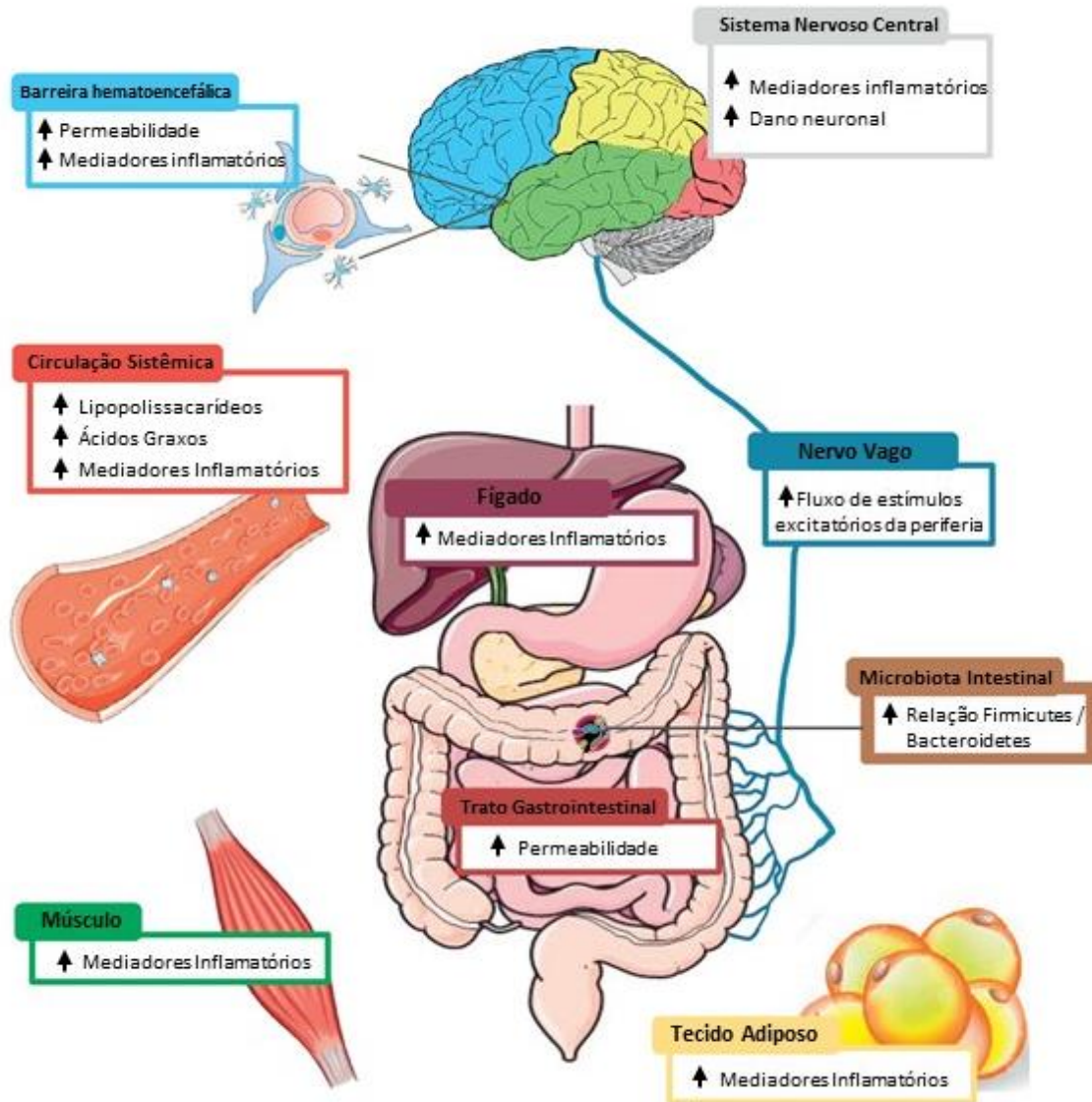


Figura 2 - Obesidade induz mudança na composição da microbiota intestinal e a inflamação metabólica em todo o organismo. Fonte: Adaptada de Guillemot-Legrís & Muccioli, 2017.

## 2.6 MODELOS PARA ESTUDAR A MICROBIOTA INTESTINAL

Várias estratégias têm sido usadas para estudar o impacto da microbiota intestinal na função cerebral, incluindo o uso de antibióticos, tratamentos com probióticos, transplante de

microbiota fecal, estudos de infecção gastrointestinal e estudos com camundongos isentos de germes.

Os camundongos isentos de germes, que são animais desprovidos de qualquer contaminação bacteriana, oferecem a possibilidade de estudar o impacto da ausência completa de uma microbiota gastrintestinal sobre diversos parâmetros fisiológicos, incluindo alterações comportamentais em testes padronizados. Camundongos isentos de germes também permitem o estudo do impacto de uma entidade particular (por exemplo, probiótico) no eixo microbiota-intestino-cérebro, ajudando a fornecer informações sobre o papel dos microrganismos intestinais na função do hospedeiro. Também é possível a condução de estudos de transplante de microbiota fecal de condições humanas específicas ou de modelos animais de doença. No entanto, camundongos isentos de germes têm déficits permanentes no desenvolvimento neurológico e alterações no eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal, resultando em uma resposta exagerada ao estresse. Ademais, os dados obtidos a partir de estudos em animais isentos de germes não são translacionais para doenças humanas, pois não representam nenhuma situação real na população humana (Luczynski et al., 2016; Grover, 2014; Gareau et al., 2010).

Estudos de infecção têm sido usados para avaliar os efeitos de bactérias patogênicas sobre o SNC por meio de testes comportamentais. Os efeitos deste tipo de abordagem são mediados em grande parte pela ativação do sistema imunológico. Por outro lado, a administração de antibióticos pode perturbar a composição da microbiota de maneira controlada temporalmente e clinicamente realista e, portanto, é uma ferramenta poderosa para avaliar o papel da microbiota intestinal em diversos sistemas fisiopatológicos. No entanto, muitos antimicrobianos têm efeito sistêmico e isso deve ser levado em consideração ao interpretar seus efeitos (Cryan & Dinan, 2012).

Em resumo, a variedade de técnicas para manipulação da microbiota intestinal, possibilita o avanço na compreensão de como a composição da microbiota influencia o cérebro e a execução de comportamentos específicos. Este tipo de abordagem permitirá uma compreensão mais completa da comunicação do eixo cérebro-intestino em estados de disfunção metabólica que ocorre por exemplo na obesidade (Dinan & Cryan, 2013). Dessa forma, a hipótese deste estudo foi de que a modulação da microbiota intestinal está envolvida na disfunção cognitiva associada à obesidade e na expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico hepático.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel da microbiota intestinal sobre a disfunção cognitiva induzida pela dieta hiperlipídica e sobre a expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico hepático em camundongos.

#### 3.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da administração de antibióticos para modulação da microbiota intestinal de camundongos C57BL/6 machos, alimentados com dieta normo ou hiperlipídica, sobre as seguintes variáveis na vida adulta:

- Ganho de peso, ingestão de energia e ingestão hídrica.
- Glicemia em jejum.
- Testes comportamentais (campo aberto, reconhecimento de objeto e suspensão pela cauda).
- Análise da microbiota intestinal pela sequência do gene 16S rRNA em DNA extraído de amostras fecais.

Avaliar o efeito da administração de antibióticos para modulação da microbiota intestinal de camundongos C57BL/6 e *ob/ob* machos, alimentados com dieta normo ou hiperlipídica, sobre as seguintes variáveis na vida adulta:

- Expressão de genes relacionados a lipogênese e processo inflamatório no fígado.
- Características histológicas do tecido hepático.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os procedimentos realizados com animais seguiram as recomendações do Guia para Saúde e Uso de Animais de Laboratório da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (Brasil, 2013). Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (CEUA-UNB) com número de protocolo nº 3/2017 - Anexo A.

A eutanásia foi realizada de acordo com as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA (Brasil, 2018) e do Guia para Boas Prática para Eutanásia em Animais do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2013). Após eutanásia as carcaças dos animais foram descartadas seguindo as normas para este tipo de resíduo, Lei Nacional de Resíduos Sólidos Nº 12.305/2010.

### 4.2 MODELO ANIMAL E DIETA

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 com 6 semanas de idade provenientes do biotério da Universidade Católica de Brasília. Os animais foram separados em grupos de 4 animais e mantidos em microisoladores, com temperatura controlada (23-25°C) e ciclo claro/escuro de 12 horas cada (escuro entre 18h00 e 6h00). Os animais passaram por uma semana de adaptação antes do início do tratamento.

Para complementar a investigação do papel da microbiota sobre a expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico hepático foram utilizados camundongos *ob/ob* machos (espécie *Mus musculus*, Ordem *Rodentia*, Família *Muridae*, cepa C57Bl/6J), isogênicos, obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia, da Universidade Federal de São Paulo – CEDEME. Os animais chegaram ao Biotério da UnB na 12ª semana de vida e tiveram 1 semana de adaptação ao novo ambiente antes de iniciar o tratamento. Os camundongos *ob/ob* foram individualizados e mantidos em microisoladores, com temperatura controlada (23-25°C) e ciclo claro/escuro de 12 horas cada (escuro entre 18h00 e 6h00). No caso do experimento com os camundongos *ob/ob*, o material (RNA hepático

e tecido hepático para histologia) foram oriundos de outro projeto de pesquisa desenvolvido previamente no Laboratório de Farmacologia Molecular (Viana, 2018).

A leptina é o produto específico do adipócito do gene *ob*. Sua expressão em animais alimentados reflete o tamanho dos adipócitos e a massa de gordura corporal. A leptina sinaliza o *status* dos estoques de energia do corpo para o cérebro, onde os sinais emanam para regular a ingestão de alimentos e o gasto energético de todo o corpo. O gene da leptina foi identificado no camundongo *ob/ob* obeso deficiente em leptina (*Lep-Ob<sup>-/-</sup>*) por técnicas de clonagem posicional. Camundongos *ob/ob* deficientes em leptina são um dos modelos de obesidade mais investigado. Eles apresentam fenótipo de obesidade mórbida, hiperfagia, resistência à insulina e infertilidade (Houseknecht & Portocarrero, 1998; Shimizu et al., 2017).

Água e dieta foram fornecidos *ad libitum* e os animais foram alimentados com dieta controle (CD) ou dieta hiperlipídica (HF). A dieta normolipídica (64,0% de carboidratos, 20,3% de proteínas e 15,8% de lipídeos) ou hiperlipídica (27,6% de carboidratos, 15,2% de proteínas, 57,2% de lipídeos), foram fornecidas na forma de *pellet* e obtida da empresa PRAGSOLUÇÕES Biociências®. A composição da CD e da HFD estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição das dietas controle e hiperlipídica.

Ingrediente	Normolipídica		Hiperlipídica	
	kcal	%kcal	kcal	%kcal
Amido de milho	1590	39,8%	638	11,9%
Caseína	800	20,0%	800	15,0%
Amido dextrinizado	528	13,2%	400	7,5%
Sacarose	400	10,0%	400	7,5%
Óleo de soja	630	15,8%	360	6,7%
Mix vitaminas AIN-93	40	1%	40	0,7%
L-cistina	12	0,3%	12	0,2%
Banha	0	0%	2700	50,5%
Total	400	100%	5350	100%

Valores referentes a 1kg de dieta. Fonte: PRAGSOLUÇÕES Biociências®

### 4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo *in vivo* foi conduzido seguindo dois delineamentos experimentais. No primeiro, os camundongos C57BL/6 alimentados com CD ou HFD e foram tratados com

veículo ou antibióticos (AB) para investigar o papel da microbiota intestinal sobre disfunção cognitiva. No segundo, inclui-se camundongos *ob/ob* que foram alimentados com CD e tratados com veículo ou AB para auxiliar na investigação do papel da microbiota sobre a expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico hepático.

#### 4.3.1 Experimento 1

Com a idade de 7 semanas, os camundongos C57BL/6 foram separados em 4 grupos nos dois cenários de dieta, normolipídica ou hiperlipídica, designados em:

- (i) CD e veículo (CD), animais que receberam dieta controle e tratamento com veículo (n=6).
- (ii) CD e antibióticos (CD+AB), animais que receberam a dieta controle e o tratamento com antibióticos (n=6).
- (iii) HFD e veículo (HFD), animais que receberam dieta hiperlipídica e tratamento com veículo (n=6).
- (iv) HFD e antibióticos (HFD+AB), animais que receberam a dieta hiperlipídica e o tratamento com antibióticos (n=6).

Para a modulação da microbiota intestinal, o regime de antibióticos utilizado foi de ciprofloxacina 0,2 g/L, cujo espectro de ação inclui de bactérias Gram-negativas, e vancomicina 0,5 g/L, cujo espectro de ação inclui bactérias Gram-positivas, da 10<sup>a</sup> à 15<sup>a</sup> semana (5 semanas), na água potável, conforme esquema utilizado previamente por Suez et al. (2014). Ambos os antibióticos foram diluídos na água filtrada e para a completa diluição da ciprofloxacina foi necessário acrescentar 280 µL/L de ácido acético glacial. A troca das soluções de antibióticos aconteceu duas vezes por semana. Os animais que não pertenciam aos grupos tratados com antibióticos receberam apenas água filtrada.

As fezes foram coletadas na 10<sup>a</sup> e 15<sup>a</sup> semana, antes e ao final do tratamento com AB, para análise da microbiota intestinal pelo sequenciamento do gene 16S rRNA em DNA extraído das fezes.

Na 12<sup>a</sup> semana foi realizado o teste de tolerância à glicose (TTG). Os testes comportamentais foram realizados na 14<sup>a</sup> semana. O peso corporal (em gramas) e a ingestão de dieta (em gramas) foram mensurados semanalmente entre a 7<sup>a</sup> e a 14<sup>a</sup> semanas de vida, e o

consumo de água (em mL) duas vezes por semana. A partir dos dados obtidos, foram calculadas as seguintes variáveis:

(i) Ganho de peso (em g) durante o tratamento: peso ao final do tratamento – peso no dia de início do tratamento.

(ii) Ingestão hídrica durante o tratamento: expressa como ingestão média (mL) diária (mL/d).

(iii) Energia ingerida durante o tratamento: soma da energia ingerida durante todo o período de tratamento, considerando a quantidade de energia, em kcal, por grama de dieta.

A eutanásia aconteceu na 15ª semana. Um total de 24 animais foram anestesiados com isoflurano e submetidos a decapitação. Foram retiradas amostras de fígado, armazenadas para análise histológica e expressão gênica por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real. O sangue foi puncionado do coração após a eutanásia, centrifugado por 10 min a 3000 g e armazenado a -80°C.

As fezes coletadas antes do tratamento com antibióticos e ao final do experimento, para avaliar a composição da microbiota intestinal, foram processadas para extração do DNA e sequenciamento do gene 16S rRNA.

O delineamento experimental está esquematizado na figura a seguir:

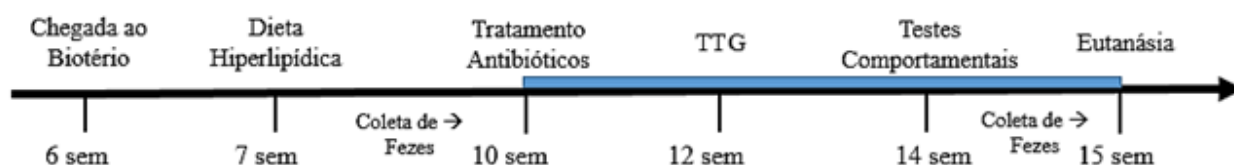


Figura 3 - Camundongos C57BL/6 machos foram tratados com dieta normo ou hiperlipídica, da 7ª a 15ª semanas de vida. Da 10ª semana ao final da 15ª semana de vida, 3 grupos de animais receberam, adicionalmente, tratamento com antibióticos na água de beber, para promover a modulação da microbiota intestinal. Com 12 semanas de vida, os camundongos foram submetidos ao teste de tolerância à glicose (TTG) e na 14ª semana os animais fizeram os testes comportamentais. Os animais foram eutanasiados na 15ª semana, momento em que foram coletados fezes, sangue e tecidos para posterior avaliações.

### 4.3.2 Experimento 2

Dez camundongos *ob/ob* machos com 12 semanas de idade foram divididos em dois grupos:

- (i) *ob/ob* e veículo (ob), animais alimentados com CD tratados com veículo (n=5).
- (ii) *ob/ob* e antibióticos (ob+AB), animais alimentados com CD tratados com antibióticos (n=5).

Os antibióticos ciprofloxacina e vancomicina foram administrados na água de beber nas concentrações de 0,2 g/L e 0,5 g/L, respectivamente, durante 4 semanas (da 17<sup>a</sup> à 21<sup>a</sup> semanas de vida). Na 21<sup>a</sup> semana os animais foram eutanasiados por decapitação. Foram coletadas amostras de fígado, que foram armazenadas a -80°C para avaliação da expressão gênica.

Como descrito anteriormente, estes animais foram objeto de outro projeto desenvolvido no Laboratório de Farmacologia Molecular, com o objetivo de investigar o efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos sobre o efeito hiperglicemiante das estatinas (Viana, 2018). Para este estudo, foram utilizados somente amostras dos grupos experimentais controle (veículo ou uso de antibióticos).

O delineamento experimental está esquematizado na figura a seguir:

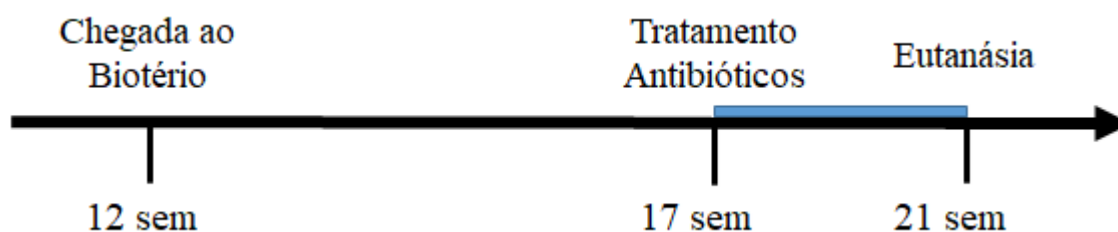


Figura 4 - Camundongos *ob/ob* machos foram alimentados com dieta normolipídica e a partir da 17<sup>a</sup> semana ao final da 21<sup>a</sup> semana de vida tratados com controle (n=5) ou antibióticos na água de beber, para promover a modulação da microbiota intestinal (n = 5). Ao final da 21<sup>a</sup> semana de vida, os animais foram eutanasiados e foi coletado o fígado para avaliação posterior.

## 4.4 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (TTG)

O TTG foi realizado após jejum diurno de 6 horas, sem restrição de acesso à água. Coletou-se amostra de sangue da cauda para determinação da glicemia basal (tempo zero) e,

posteriormente, os animais receberam por via intraperitoneal solução de glicose, na dose de 1g/kg de peso corporal. Amostras de sangue da cauda foram coletadas após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos da injeção de glicose e analisadas com tiras reativas em glicosímetro (Accucheck Performa, Roche).

#### **4.5    TESTE DO CAMPO ABERTO**

O teste do campo aberto foi utilizado para investigar a atividade locomotora dos animais, a fim de excluir a possibilidade de que uma alteração no tempo de reconhecimento de objeto e imobilidade, avaliado nos teste de reconhecimento de objeto e suspensão pela cauda (descritos a seguir) fosse devida a alterações da atividade locomotora. A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do estresse e do conflito provocado pelo ambiente novo (Prut e Belzung, 2003). Isso permite uma mensuração do nível de excitabilidade do sistema nervoso. O teste foi realizado em uma arena feita de madeira com assoalho branco, dividido por linhas pretas em 19 quadrantes e cercado por paredes elevadas com 50 cm de altura. Cada camundongo foi colocado no centro do campo aberto e o número total de cruzamentos foi registrado por 5 minutos. Um cruzamento foi registrado quando o animal atravessou um quadrante com as quatro patas.

#### **4.6    TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETO**

O teste de reconhecimento do objeto avalia a memória de reconhecimento em roedores. A tarefa de reconhecimento de objetos avalia a habilidade de roedores em reconhecer um novo objeto na arena utilizada no teste de campo aberto. Neste teste, não há reforços positivos ou negativos, e esta metodologia afere a preferência natural por novos objetos exibida por roedores. O procedimento experimental consiste de três fases: habituação, familiarização e a fase de teste (Clark et al, 2000).

No teste de reconhecimento de objeto, o animal é familiarizado com um objeto e, então, após uma hora, é apresentado simultaneamente ao mesmo objeto e a um novo objeto. Os objetos utilizados apresentam nível exploratório, complexidade física e tamanho similares.

Neste estudo, foi inicialmente realizada uma sessão de treino. Para isso, dois objetos idênticos foram apresentados aos camundongos. Neste momento, foi registrado o tempo de exploração de cada um dos objetos colocados na arena, durante 5 minutos. Os animais retornaram às suas gaiolas imediatamente depois do treino. Uma hora após o treino, os animais foram reintroduzidos no campo aberto que continha um objeto novo e um objeto previamente explorado. Neste período registrou-se, novamente, o tempo de exploração de cada um dos objetos durante 5 minutos. Os seguintes comportamentos foram considerados como exploração do objeto: cheirar, tocar ou observar o objeto a menos de 1 cm de distância.

Para medir a memória de reconhecimento, foi calculado o índice de discriminação (Greco et al., 2010), com a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de discriminação} = \frac{t(s) A2 \times 100}{t(s) A2 + t(s) A1}$$

Em que A2 foi o tempo gasto pelos animais explorando o objeto novo e A1 foi o tempo gasto pelos animais explorando o objeto previamente explorado.

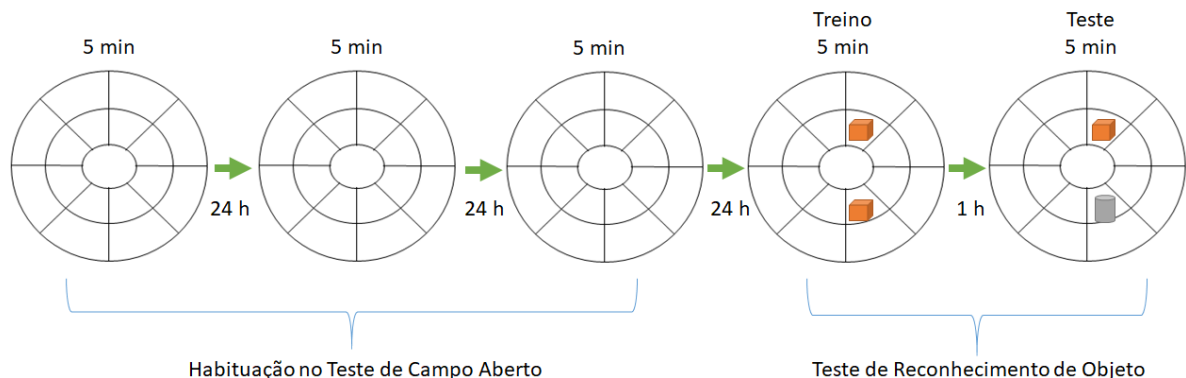


Figura 5 - Esquema dos Testes de Campo Aberto e Reconhecimento de Objeto. Fonte: Adaptado de Leger et al., 2013.

#### 4.7 TESTE DE SUSPENSÃO PELA CAUDA

Objetivo do teste é avaliar a atividade depressiva em modelo experimental. Medidas relacionadas à resignação (“desespero comportamental”) são utilizadas como o principal parâmetro comportamental nos testes de avaliação de atividade antidepressiva em camundongos, como o teste da suspensão pela cauda. Animais submetidos a curtos e inescapáveis períodos de estresse sendo suspensos pela cauda, apresentam dois tipos de

comportamentos alternados, a agitação, característica da tentativa de escape da situação de estresse, e a imobilidade (Steru et al., 1985). Portanto, os camundongos são considerados imóveis quando houve ausência de movimento ou movimentação passiva. A duração total da imobilidade induzida pela suspensão pela cauda foi registrada por observador experiente durante o período total de 6 minutos, em que os camundongos ficaram suspensos a 50 centímetros do chão, presos por uma fita adesiva a 1 centímetro da base de suas caudas (Brocardo et al., 2008).

#### 4.8 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

A concentração sérica de triglicerídeos, HDL colesterol (HDL-c), fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram analisadas por método enzimático utilizando kits comerciais (TG color GPO/PAP AA líquida, HDL Colesterol monofase AA plus, GPT [ALT] UV AA líquida, GOT [AST] UV AA líquida, ALP 405 AA líquida, da Wiener lab.), de acordo com as instruções do fabricante, em analisador químico automático (CT600i, Wiener, Brasil).

#### 4.9 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL PELA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA

A avaliação da composição da microbiota intestinal foi realizada pela empresa Neopropecta Microbiome Technologies (Christoff et al., 2017).

Para isso, foi utilizado um protocolo de PCR de dois passos, ou duas reações de PCR. Na primeira reação de PCR, foram utilizados os *primers* V3-V4 341F-806R, pois esse par tem grande cobertura taxonômica em bactérias e Archaea. Em seguida, utilizaram-se os *primers* V3-V4; os primeiros *primers* de PCR contêm as sequências Illumina baseadas no adaptador de estrutura TruSeq (Illumina, San Diego, CA), permitindo a segunda PCR com sequências de indexação. As reações de PCR foram sempre realizadas em triplicatas utilizando Platinum Taq (Invitrogen, EUA) com as condições: 95°C por 5 min, 25 ciclos de 95°C por 45s, 55°C por 30s e 72°C por 45s e extensão final de 72°C por 2 min para PCR 1. Para PCR 2 as condições foram



95°C por 5 min, 10 ciclos de 95°C por 45s, 66°C por 30s e 72°C por 45s e uma extensão final de 72°C durante 2 min.

Para comparação, o protocolo Illumina 16S foi usado conforme descrito (Nota Técnica da Illumina 15044223 Rev. B, 2017). As bibliotecas foram sequenciadas em um sistema MiSeq, usando os *primers* padrão Illumina fornecidos no kit.

#### **4.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA**

Para a análise histológica, as amostras do tecido hepático foram fixadas em formol salino a 10%. Foram desidratados em uma série gradativa de soluções alcoólicas; álcool etílico 70%, 80%, 95% e 3 passagens no álcool absoluto. Depois, as amostras de fígado passaram pelo processo de clareamento com xilol, impregnação em parafina, com o auxílio do histotécnico Oma DM-40. Foram feitos cortes de 5 µm de espessura, no micrótomo Leica Biosystems, modelo RM 2235 (Leica Biosystems, Alemanha). A etapa de coloração foi feita com hematoxilina-eosina, para análise das amostras teciduais quanto à ocorrência de alterações morfológicas. As lâminas histológicas foram analisadas com o scanner Aperio AT Turbo (Copyright © 2013 Leica Biosystems Imaging, Inc) no aumento de 20x. As imagens histológicas digitalizadas foram visualizadas utilizando o programa de leitura de imagens Aperio ImageScope (Copyright © Aperio Technologies, Inc. 2003 2014. All Rights Reserved).

#### **4.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA**

O RNA total foi extraído das amostras de fígado. Para isso, as amostras foram descongeladas e homogeneizadas com 15 mL de reagente Trizol (Invitrogen, Life Technologies) na proporção de 0,1g de tecido por mL de Trizol, com a utilização de um homogeneizador de tecidos. As amostras de tecido foram então incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos e, em seguida, centrifugadas a 14000 rpm, durante 10 minutos, a 4°C, com formação de uma fina camada de gordura na parte superior do tubo, que foi descartada e as amostras centrifugadas novamente.

O sobrenadante foi então transferido para microtubos de 1,5 mL e o pellet descartado. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio por mL de Trizol utilizado na etapa de homogeneização. Os tubos foram agitados em vórtex durante 15 segundos, incubados a temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugados a 14 000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C.

Houve a formação de três fases, fase inferior de coloração vermelha, que contém o DNA; fase intermediária de coloração branca, contendo proteínas; e fase superior incolor, que contém o RNA. Apenas a fase superior (aquosa) que contém o RNA foi transferida para outro microtubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 500 µL de isopropanol absoluto (por mL de Trizol utilizado na etapa de homogeneização). Os tubos foram agitados em vórtex, incubados durante 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugados a 14 000 rpm, durante 10 minutos, a 4°C, com formação de pellet de RNA. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foi adicionado 1 mL de etanol 75% gelado. Os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 9000 rpm, durante 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos vertidos sobre gaze estéril para secagem do pellet. O pellet foi então ressuspensionado em volumes de 20 a 50 µL de água deionizada tratada com dietilpirocarbonato 0,1% (DEPC 0,1%) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e as amostras mantidas a -80°C até sua utilização.

#### **4.11.1 Quantificação do RNA total e determinação da pureza da amostra**

A concentração de RNA total e o grau de pureza das amostras foram determinados no espectrofotômetro de microvolume Nanovue (GE Health Sciences®, Life Sciences, Buckinghamshire, UK), utilizando-se 1 µL da amostra. A concentração de RNA, fornecida automaticamente pelo equipamento em µg/µL, é determinada pelo seguinte cálculo:  $(DO_{260} \text{ nm} \times 40) / 1000$ , em que  $DO_{260}$  representa o valor da densidade óptica da amostra determinada no comprimento de onda 260 nm. O grau de pureza da amostra, também fornecido automaticamente pelo equipamento, é calculado pela razão entre as densidades ópticas nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. As amostras são consideradas satisfatórias quando essa razão se mantiver entre 1,6 e 2,2, uma vez que estes valores representam baixa contaminação da amostra com proteínas. Nessa perspectiva, foram utilizadas somente as amostras que se enquadraram nos parâmetros anteriormente citados.

#### **4.11.2 Tratamento do RNA com DNase I**

As amostras de RNA total foram tratadas com enzima desoxirribonuclease (DNase) (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA) durante 10 minutos, a temperatura ambiente e de acordo

com o protocolo do fabricante, com a finalidade de evitar possibilidade de contaminação com DNA genômico e, conseqüentemente, sua influência sobre a avaliação da expressão gênica.

#### **4.11.3 Avaliação da integridade do RNA**

Para determinar a integridade do RNA nas amostras, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1%, com o objetivo de visualização do RNA ribossômico 18S e 28S. A observação de bandas correspondentes ao RNA ribossômico 18S e 28S foi considerada indício de não degradação de RNA nas amostras.

#### **4.11.4 Análise da expressão gênica (RNAm) por PCR em tempo real quantitativa**

A transcrição reversa (RT) e a amplificação do cDNA foram realizadas a partir do RNA total extraído das amostras, em único passo, por PCR quantitativa em tempo real utilizando o kit Power SYBR® Green RNA-to-CT 1-Step (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O produto de amplificação de cada amostra foi analisado pelo fluoróforo SYBR® Green. A fluorescência detectada é representada por meio do Ct (ciclo limiar, *cycle threshold*), que representa o ciclo na reação de amplificação a partir do qual a amplificação se torna exponencial.

As reações foram preparadas em placas de 96 poços (MicroAmp Optical, Applied Biosystems), em duplicatas, para um volume final de 10 µL. Uma reação sem amostra de RNA (controle negativo) foi realizada para cada par de *primers*, a fim de se verificarem possíveis contaminações.

As reações foram conduzidas em termociclador AB7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As sequências dos iniciadores ou *primers* utilizados estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Sequência dos *primers* utilizados para determinação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real.

<i>Primer</i>	Proteína correspondente	Sequência
<i>ACOX1</i>	Acil-CoA Oxidase	F: 5'-TTTGTTGTCCCTATCCGTGAGA-3' R: 5'-GCCGATATCCCCAACAGTGA-3'
<i>CPT1A</i>	Carnitina Palmitoil Transferase	F: 5'- CTCAGTGGGAGCGACTCTTCA -3' R: 5'- GGCCTCTGTGGTACACGACAA -3'
<b>Gapdh</b>	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)	F: 5'-AAGGGCTCATGACCACAGTC-3' R: 5'-CAGGGATGATGTTCTGGGCA-3'
<i>PPAR-<math>\alpha</math></i>	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos alfa	F: 5'- GCAAACCTGGACTTGAACG-3' R: 5'- AGGAGGACAGCATCGTGAAG-3'
<i>TNF- <math>\alpha</math></i>	Fator de Necrose Tumoral Alfa	F: 5'- CCTCACACTCAGATCATCTTCT -3' R: 5'- GCTACGACGTGGGCTACAG -3'

As condições de termociclagem durante a PCR foram:

- Programa de transcrição reversa: 48°C durante 30 minutos;
- Ativação da Taq DNA polimerase: 95°C durante 10 minutos;
- Quarenta ciclos de desnaturação (95°C durante 15 segundos), anelamento e amplificação (60°C durante 1 minuto);
- Curvas de dissociação (programa de dissociação do produto de amplificação): realizado após cada reação com o objetivo de se verificar sua especificidade, confirmando a ausência de formação de dímeros de *primers* e/ou de produtos inespecíficos de amplificação. Para isso, as amostras foram submetidas a aumentos gradativos de temperatura (acréscimos de 0,3°C) de 60°C para 95°C. À medida que a temperatura aumenta, a fluorescência decresce. O ponto correspondente ao decaimento mais acelerado do sinal de fluorescência é denominado de temperatura de dissociação,  $T_m$  (*melting temperature*) e determina o momento em que o produto de PCR apresenta-se 50% em fita dupla e 50% em fita simples. A  $T_m$  é específica para cada sequência de DNA amplificada e, assim, espera-se que apenas um pico de decaimento seja detectado para cada par de *primers* utilizado.

A expressão relativa do RNAm para cada um dos genes alvo foi determinada pelo método comparativo  $\Delta\Delta C_t$ , com normalização para o gene de referência que codifica a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*). Para isso, os valores de  $C_t$  obtidos para cada amostra nas reações de amplificação dos genes alvo (cuja expressão se objetivou quantificar) foram subtraídos do valor do  $C_t$  obtido para as mesmas amostras nas reações de amplificação do gene referência (*Gapdh*), sendo obtido o  $\Delta C_t$ .

$$\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene referência}$$

A quantificação relativa de cada gene alvo foi obtida por meio do método de comparação de Ct ou  $\Delta\Delta Ct$ . Segundo este método, a expressão relativa do gene alvo corresponde ao valor obtido pela fórmula aritmética  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , em que  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ intervenção} - \Delta Ct \text{ calibrador}$ .

#### 4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos relativos ao peso, consumo de água e dieta e teste de tolerância à glicose foram expressos como média e erro padrão da média de cada grupo de tratamento. Todas as análises foram realizadas com a utilização do programa GraphPad Prism versão 5.0 para Windows. O teste t de Student não pareado foi usado para comparar a média entre dois grupos, a análise de variância Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste Dunns foi usada para comparar as médias entre múltiplos grupos, e a análise de variância de dois fatores (two-way ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni foi utilizada para comparar as médias entre múltiplos grupos quando se tinha tratamento em relação ao tempo. O critério de significância para todas as análises foi o valor  $p < 0,05$ . Análise de coluna para teste de reconhecimento de objeto para determinar se o índice de discriminação difere significativamente de um valor teórico de 50% (i.e., nível de chance). \*  $p < 0,05$  versus 50% (objeto novo).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM ANTIBIÓTICOS E DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE A COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL

A composição da microbiota intestinal dos animais alimentados com as duas dietas (CD e HFD) foi avaliada antes e depois do tratamento com antibióticos. Os animais alimentados com CD apresentaram maior variedade de filos predominantes, enquanto o grupo alimentado com a HFD apresentou o filo Firmicutes com maior predominância. O tratamento com antibióticos alterou significativamente a composição da microbiota intestinal. Houve um aumento na representação dos filos Firmicutes e Proteobacteria no grupo CD+AB, comparado ao grupo CD. Por outro lado, os camundongos HFD+AB apresentaram diminuição em Firmicutes e aumento na representação de Proteobacteria, quando comparados com o grupo HFD (Figura 6A). A composição da microbiota intestinal individual inicial e final é apresentada no Anexo B.

A composição inicial da microbiota intestinal pelo grupo CD foi de 36% Firmicutes, 23% Bacteroidetes, 16% Proteobacteria, 14% Verrucomicrobia, 9% Actinobacteria e 2% de Deferribacteres. No grupo CD+AB, antes do tratamento com antibióticos, foi de 33% Verrucomicrobia, 32% Firmicutes, 21% Bacteroidetes, 10% Proteobacteria, 2% Actinobacteria e 2% de Deferribacteres. Inicialmente ambos os grupos apresentaram maior representatividade das espécies *Lactobacillus murinus* e *Clostridium leptum* para o filo Firmicutes, *Parabacteroides goldsteinii* e *Bacteroides xylanisolvens* no filo Bacteroidetes, *Akkermansia muciniphila* no filo Verrucomicrobia.

Ao final do experimento, a composição da microbiota intestinal foi de 35% Firmicutes, 8% Bacteroidetes, 7% Proteobacteria, 43% Verrucomicrobia, 7% Actinobacteria e 0% de Deferribacteres no grupo CD. No grupo CD+AB a composição final foi de 51% Firmicutes e 49% de Proteobacteria. Não houve mudanças significativas na proporção de espécies de bactérias no grupo CD. Contudo, o grupo CD+AB teve predominância das espécies *Pediococcus pentosaceus* e *Lactobacillus reuteri* no filo Firmicutes e *Helicobacter bilis* no filo Proteobacteria

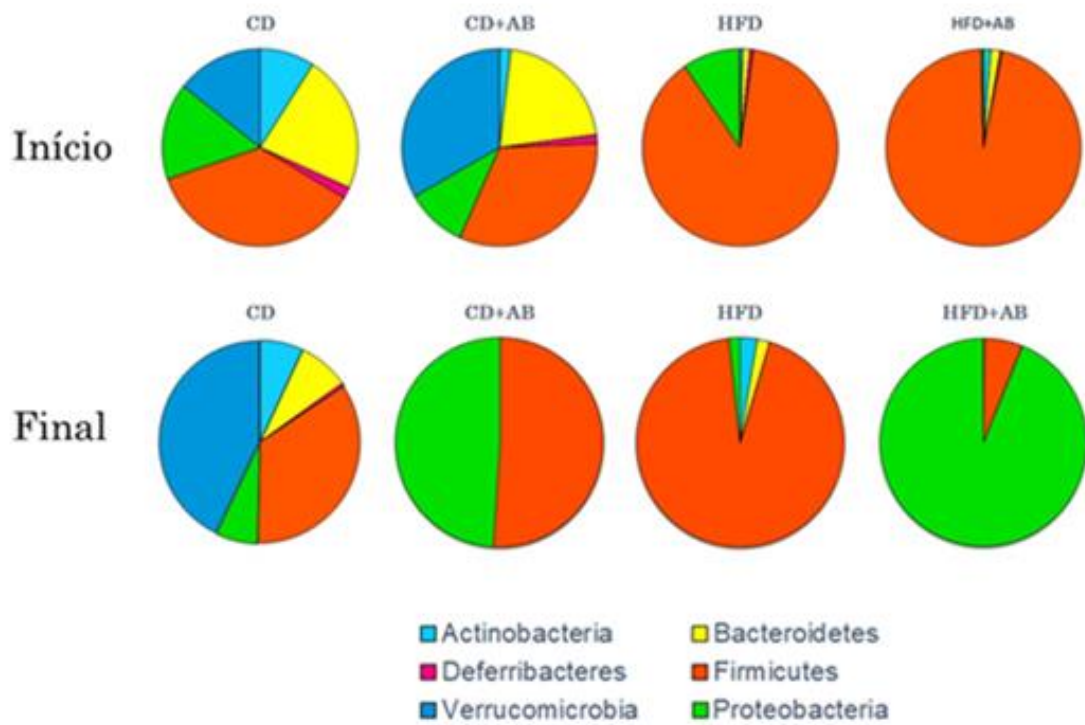
Nos grupos alimentados com HFD a composição inicial foi de 88% Firmicutes, 10% Proteobacteria, 1% Bacteroidetes, 1% Deferribacteres e 0% de Verrucomicrobia e Actinobacteria para o grupo não tratado com antibióticos e de 97% Firmicutes, 2%

Bacteroidetes, 1% Actinobacteria e 0% para Deferribacteres, Verrucomicrobia e Proteobacteria no grupo tratado. As espécies mais prevalentes nos grupos alimentados por HFD foram *Lactobacillus murinus* e *Clostridium coccoides* do filo Firmicutes, *Bacteroides intestinalis* para o filo Bacteroidetes e *Enterorhabdus mucosicola* do filo Actinobacteria.

A composição final da microbiota intestinal foi de 94% Firmicutes, 3% Actinobacteria, 2% Bacteroidetes, 1% Proteobacteria e 0% para Deferribacteres e Verrucomicrobia no grupo HFD e 94% Proteobacteria, 6% Firmicutes e 0% para Deferribacteres, Verrucomicrobia, Actinobacteria e Bacteroidetes no grupo HFD+AB. Também não houve mudanças na predominância das espécies de bactérias do início para o final do experimento no grupo HFD, entretanto houve mudanças na microbiota do grupo HFD+AB, com predominância de *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis* no filo Firmicutes e *Helicobacter bîlis* no filo Proteobacteria.

Os animais alimentados com dieta controle apresentaram redução significativa da representação do filo Bacteroidetes após o tratamento com antibióticos. De fato, a representação deste Filo ficou praticamente nula. Nos animais alimentados com HFD não foi observado alteração da razão Bacteroidetes/Firmicutes ao final do estudo, com diminuição dos Bacteroidetes induzida pela dieta, mesmo com o tratamento com antibióticos (Figura 6B).

A



B

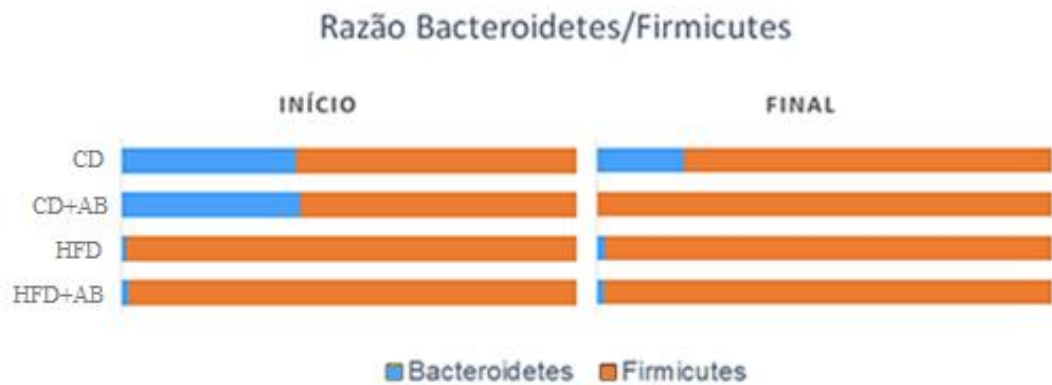


Figura 6 – Avaliação da composição da microbiota intestinal no início (10 semanas, antes do tratamento com antibióticos) e final (15 semanas, após tratamento com antibióticos) do tratamento com antibióticos. (A) Composição da microbiota intestinal determinada pelo sequenciamento do gene 16S rRNA em DNA extraído de amostras fecais, representada em filões. (B) Razão entre os filões Bacteroidetes/Firmicutes. n= 4-5 animais por grupo.



## **5.2 EFEITO DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM ANTIBIÓTICOS SOBRE A MASSA CORPORAL, INGESTÃO DE ENERGIA E INGESTÃO HÍDRICA**

A massa corporal, expressa tanto em massa (em g) em função da idade (em semanas), quanto em ganho de massa no período do acompanhamento, foi analisada considerando-se todos os grupos em conjunto, apenas os grupos que foram alimentados com o mesmo tipo de dieta, ou os grupos que receberam CD em comparação com HFD não submetidos a tratamentos com antibióticos.

Quando comparados todos os grupos, foi observado que os camundongos que receberam a HFD e antibióticos (HFD+AB) apresentaram aumento significativo do peso, avaliado em função da idade (Figura 7A), e aumento significativo do ganho de peso (Figura 7B). O tratamento com antibióticos não modificou significativamente o peso dos camundongos alimentados com CD, nas análises realizadas considerando-se todos os grupos em conjunto (Figuras 7A e 7B) mas levou a um aumento não significativo ( $p=0,1320$ ) quando comparado nos grupos que receberam CD (Figuras 7C e 7D).

Na comparação somente dos grupos alimentados com CD ou HFD, foi observado que a HFD induziu aumento de peso significativo em relação à CD (Figuras 7E e 7F). Na comparação dos grupos alimentados que receberam HFD e tratamento com antibiótico, foi observado aumento não significativo de peso naqueles tratados com antibióticos (HFD+AB) ( $p=0,3095$ ) em relação ao grupo que recebeu HFD (Figuras 7G e 7H).

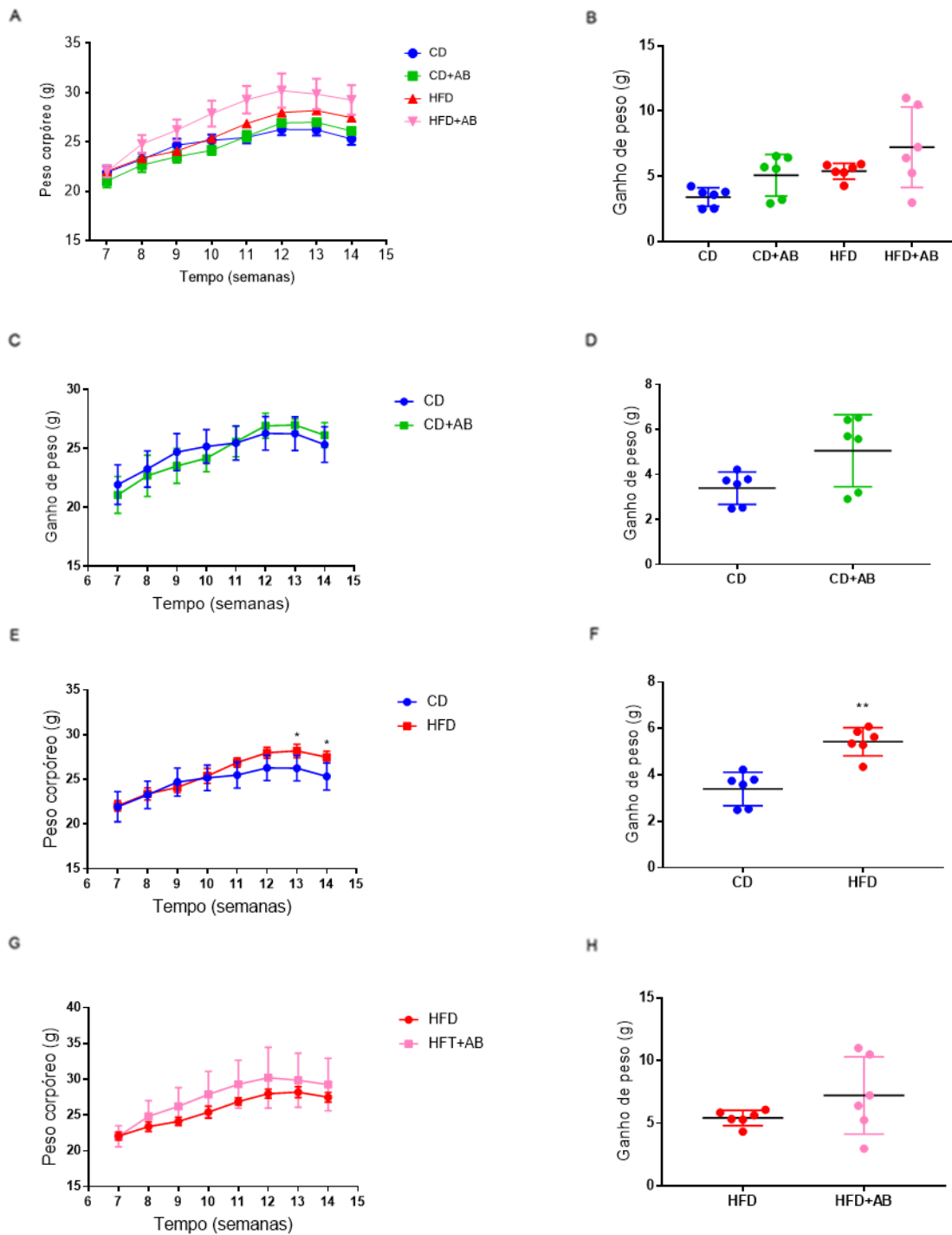


Figura 7 – Efeito da dieta e da modulação da microbiota intestinal com antibióticos sobre a massa corporal. Comparação da massa corporal segundo a idade (semanas) e do ganho de massa corporal no período do estudo considerando todos os grupos experimentais em conjunto (A e B), apenas os animais alimentados com dieta controle (C e D), animais alimentados com dieta controle ou hiperlipídica e não tratados com antibióticos (E e F) ou animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com antibióticos. Peso médio ( $\pm$  EPM) semanal entre a 7<sup>a</sup> e a 14<sup>a</sup> semanas de vida dos camundongos. Dados analisados por análise de variância de dois fatores (two-way ANOVA) seguida de pós-teste de Bonferroni (A, C, E e G). Análise do ganho de peso realizado pelo teste de variância de um fator (one-way ANOVA) seguida do pós-teste de Dunn (B) ou analisado pelo Teste T seguido do pós-teste Mann-Whitney (D, F e H),  $p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  ( $n=6$ ). CD: dieta controle, HFD: dieta hiperlipídica, AB: antibióticos.  $N=6$  animais por grupo.

O tratamento com antibióticos por 5 semanas (10<sup>a</sup> a 15<sup>a</sup> semanas de idade) não modificou a ingestão de energia (Figura 8A). A ingestão hídrica foi menor nos animais alimentados com HFD (Figura 8B).

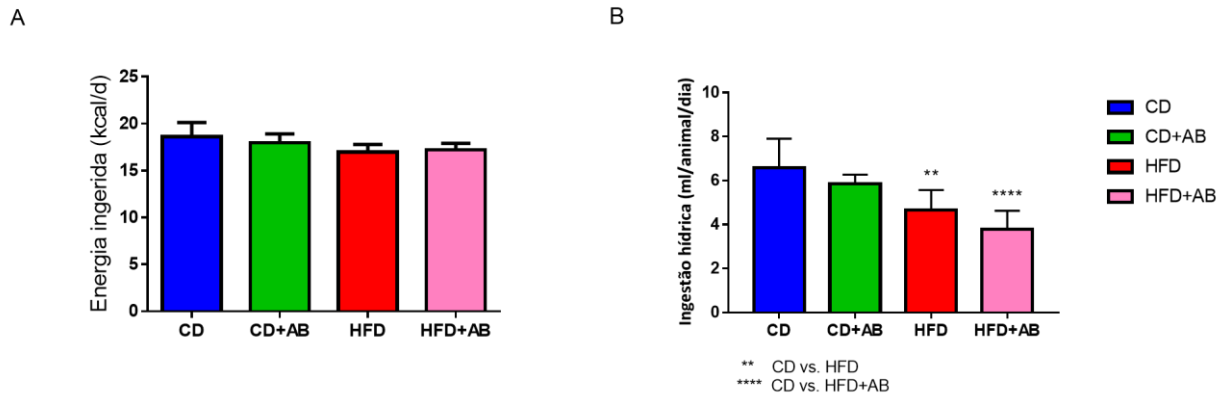


Figura 8- A modulação da microbiota intestinal com antibióticos não modificou a quantidade de energia ingerida de animais alimentados com dieta hiperlipídica ou controle (A). Camundongos alimentados com HFD ingeriram significativamente menos água quando comparados aos animais que receberam somente água filtrada (veículo) (B). Dados apresentados como média  $\pm$  EPM e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo pós-teste Dunn, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  ( $n=6$ ). CD: dieta controle, HFD: dieta hiperlipídica, AB: antibióticos.  $N=6$  animais por grupo.

### 5.3 EFEITO DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM ANTIBIÓTICOS SOBRE A TOLERÂNCIA À GLICOSE

Os resultados do teste de tolerância à glicose, realizado na 12<sup>a</sup> semana de vida dos animais, indicaram que os grupos alimentados com dieta HFD apresentaram piora da tolerância à glicose quando comparados aos que receberam CD (Figuras 9A e 9B).

Os camundongos alimentados com CD e tratados com antibióticos apresentaram aumento da tolerância à glicose quando comparados com os alimentados com CD e tratados com veículo (Figuras 9C e 9D). A HFD diminuiu significativamente a tolerância à glicose comparado ao grupo CD (Figuras 9E e 9F). O tratamento com antibiótico nos camundongos alimentados com HFD não alterou a tolerância à glicose (Figuras 9G e 9H).

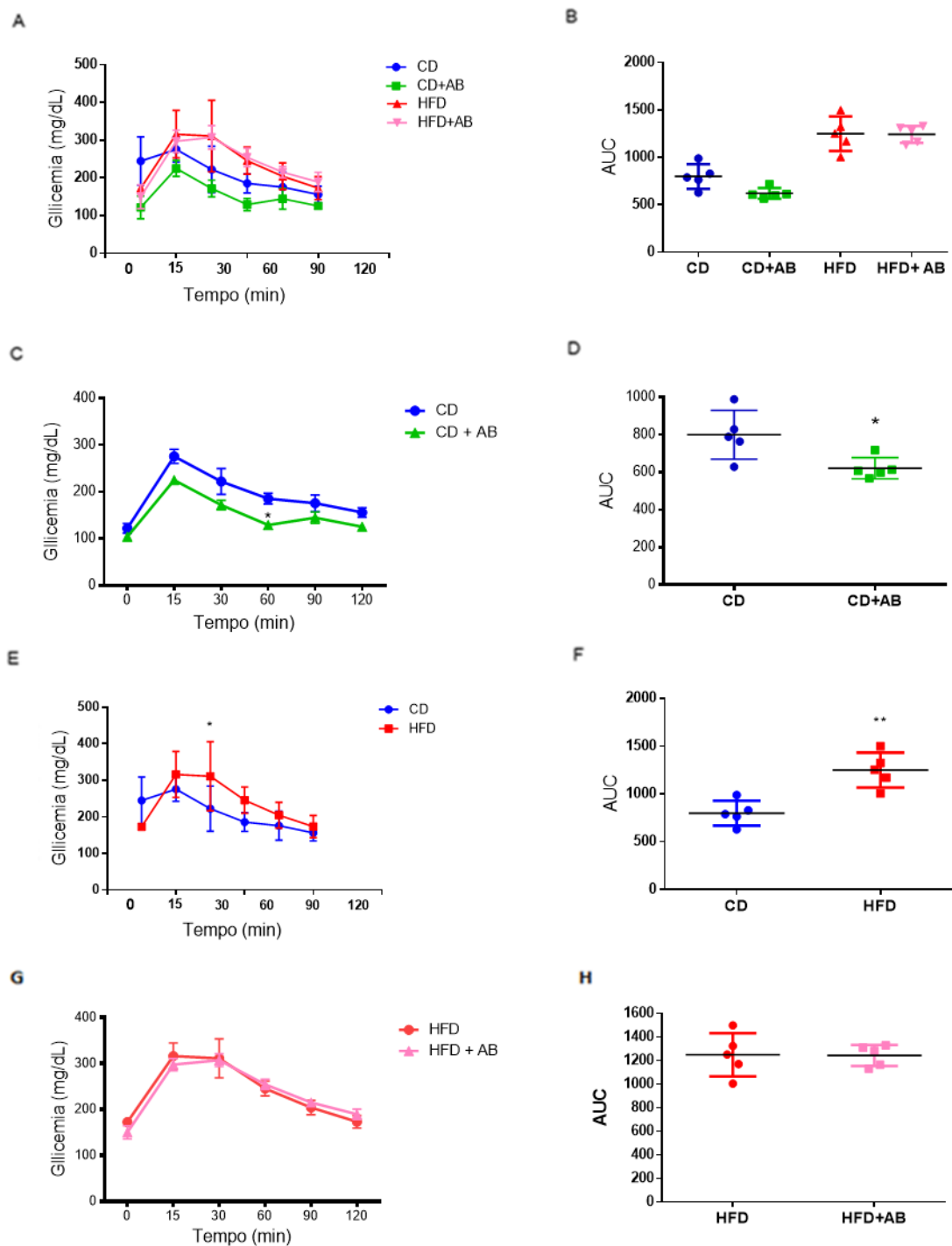


Figura 9 – Efeito da dieta e da modulação da microbiota intestinal com antibióticos sobre a tolerância à glicose na 12ª semana de vida, considerando-se todos os grupos em conjunto (A e B), apenas os grupos que receberam dieta controle (C e D), dieta controle e dieta hiperlipídica (E e F) e apenas dieta hiperlipídica (G e H). A alimentação com HFD piora a tolerância à glicose (A e B), o tratamento com antibióticos em camundongos alimentados com HFD não modifica a tolerância à glicose (E e F) e aumenta a tolerância à glicose de camundongos alimentados com CD (C e D). A glicemia foi avaliada antes (tempo 0 min) e 15, 30, 60, 90 e 120 min após a injeção de glicose (1,0 g/kg de massa corporal) após 6 horas de jejum. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM e analisados pelo teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni,  $p < 0,05$  \*,  $p < 0,01$  \*\* (n=5). CD: dieta controle, HFD: dieta hiperlipídica, AB: antibióticos. N= 6 animais por grupo.

#### 5.4 EFEITO DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM ANTIBIÓTICOS SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Na 15ª semana de vida, após 8 semanas de tratamento com dieta HFD e 5 semanas de tratamento com antibióticos, os camundongos foram eutanasiados e foi coletado sangue para avaliação bioquímica. Foram avaliadas as concentrações séricas de glicose, colesterol, triglicerídeos, HDL, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Os grupos alimentados com HFD apresentaram concentração de colesterol e HDL maior que os grupos alimentados com CD, embora o aumento não tenha sido estatisticamente significativo ( $p=0,5294$  e  $p=0,5069$ , respectivamente). Por outro lado, as concentrações de triglicerídeos foram menores nos grupos alimentados com dieta HFD quando comparado aos grupos com dieta CD ( $p=0,8352$ ), embora a diferença não tenha sido significativa. As transaminases (ALT e AST) tiveram uma redução não significativa no grupo HFD em relação aos outros grupos ( $p=0,4162$  e  $p=0,2583$ , respectivamente) (Tabela 3).

Tabela 3 – Parâmetros bioquímicos séricos. Resultados expressos em mediana e intervalo interquartil 25-75%.

	CD	CD+AB	HFD	HFD+AB
<b>Colesterol</b>	80,5 (79,2-87,7)	86,0 (68,5-94,5)	125,0 (116,0-135,5)	126,0 (119,0-139,0)
<b>Triglicerídeos</b>	96,5 (79,5-112,8)	81,0 (68,0-115,5)	66,0 (57,0-78,0)	74,0 (56,0-76,0)
<b>HDL</b>	45,5 (42,5-48,5)	50,0 (29,5-53,5)	72,0 (61,5-77,5)	78,0 (65,0-81,5)
<b>TGO/AST</b>	135,0 (48,0-171,0)	99,0 (88,5-115,5)	91,0 (67,0-186,0)	108,0 (97,50-168,5)
<b>TGP/ALT</b>	39,0 (39,0-55,0)	44,0 (38,5-46,5)	24,0 (19,0-31,5)	39,0 (36,5-53,0)

#### 5.5 EFEITO DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM ANTIBIÓTICOS SOBRE FUNÇÃO COGNITIVA AVALIADA PELO TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETO

O teste do campo aberto foi realizado durante 3 dias consecutivos para analisar a atividade locomotora e exploratória dos animais. Não houve diferenças estatisticamente significantes na atividade locomotora entre os grupos, confirmando que eventuais diferenças nesta atividade não influenciariam o resultado dos próximos testes (Figura 10A).

No teste de reconhecimento de objeto, utilizado para avaliação da memória de reconhecimento, grupo CD e HFD+AB apresentaram adequada exploração dos objetos, com índice de discriminação significativamente maior que o valor teórico de 50%, os demais grupos não reconheceram o objeto novo, indicando déficit mnemônico, caracterizado pela observação de índice de discriminação e a porcentagem de alternâncias menores que o valor teórico de 50% (Figura 10B). Nenhum dos grupos apresentaram comportamento tipo depressivo, que é indicado pelo aumento do tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda (Figura 10C).

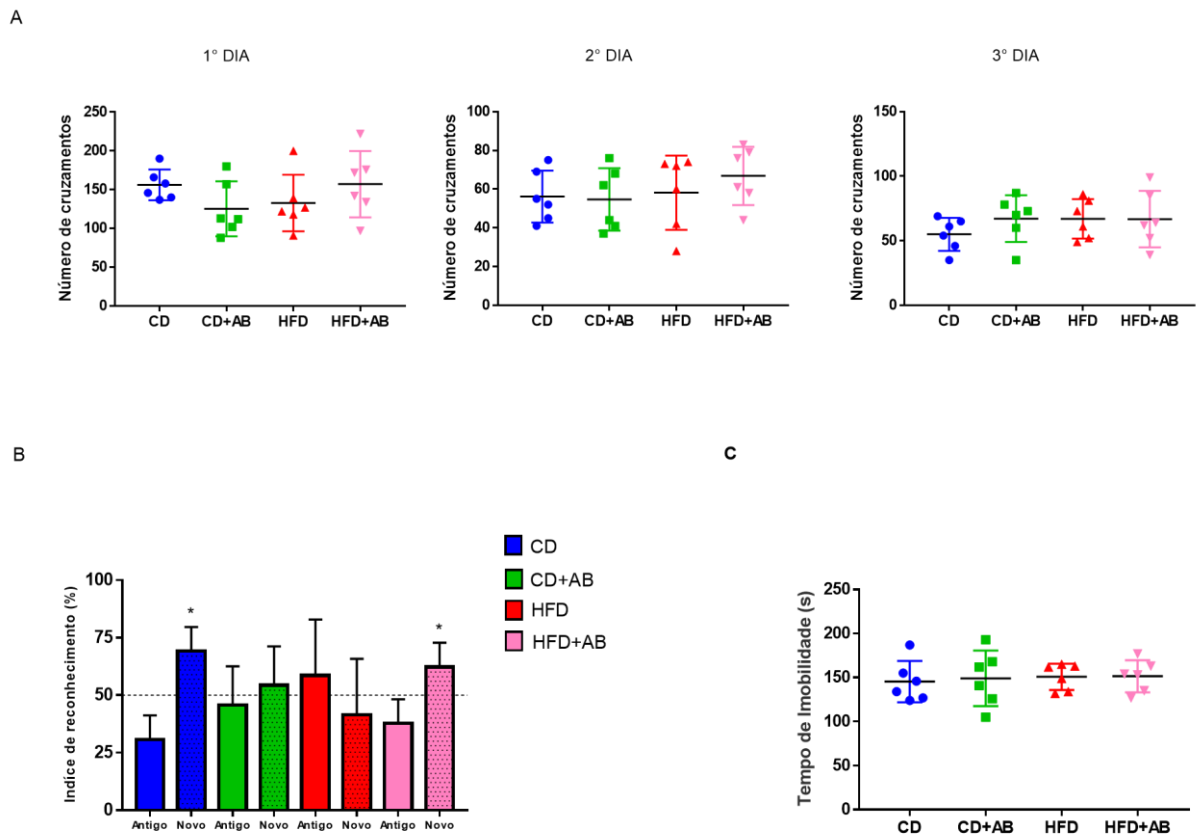


Figura 10 - Testes Comportamentais. (A) Atividade locomotora no teste do campo aberto. (B) Índice de discriminação no teste de reconhecimento de objeto. Análise do reconhecimento de objeto para determinar se o índice de discriminação e a porcentagem de alternâncias diferiam significativamente de um valor teórico de 50%. (C) Tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda. N= 6 animais por grupo.

## 5.6 EFEITO DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM ANTIBIÓTICOS SOBRE EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À OXIDAÇÃO LIPÍDICA E PROCESSO INFLAMATÓRIO NO FÍGADO

Foi avaliada a expressão dos genes que codificam o PPAR- $\alpha$ , a CPT1- $\alpha$  e a ACOX1 no fígado, relacionados à homeostase energética e  $\beta$ -oxidação no fígado. Foi observada maior expressão do transcrito *PPAR $\alpha$*  nos animais alimentados com CD e tratados com antibióticos ( $p=0,3493$ ). A alimentação com HFD na presença de antibióticos não modificou a expressão deste transcrito (Figura 11A). Foi observado aumento significativo da expressão deste transcrito nos camundongos *ob/ob* tratados com antibióticos, em relação aos não tratados (Figura 11A).

Quanto à expressão do mRNA da *CPT1A*, foi observado aumento não significativo nos alimentados com CD e tratados com antibióticos ( $p=0,3567$ ), em relação aos alimentados com CD e tratados com veículo. Não foi observado efeito da alimentação com HFD sobre este transcrito (HFD vs CD). Foi observado que o tratamento de animais alimentados com HFD com antibióticos induziu redução significativa da expressão do mRNA da CPT1- $\alpha$ , quando comparado ao tratamento de animais alimentados com HFD e tratados com veículo (Figura 11B). Não foi observada modificação significativa da expressão deste transcrito nos camundongos *ob/ob* tratados com antibióticos, em relação aos não tratados (Figura 11B).

A expressão do transcrito *Acox1* aumentou de forma não significativa nos animais alimentados com HFD e tratados com veículo ( $p=0,7857$ ), quando comparados aos alimentados com CD e tratados com veículo, e aumentou significativamente nos animais alimentados com HFD e tratados com antibióticos comparados aos animais CD tratados com antibióticos (Figura 11C). Não foi observada modificação significativa da expressão deste transcrito nos camundongos *ob/ob* tratados com antibióticos, em relação aos não tratados (Figura 11C).

A expressão do mRNA do *TNF- $\alpha$* , gene relacionado ao processo inflamatório, diminuiu significativamente no grupo alimentado com HFD e tratados com antibiótico em relação aos demais grupos (Figura 11D). Achado semelhante foi observado nos camundongos *ob/ob* tratados com antibióticos, em relação aos não tratados (Figura 11D).

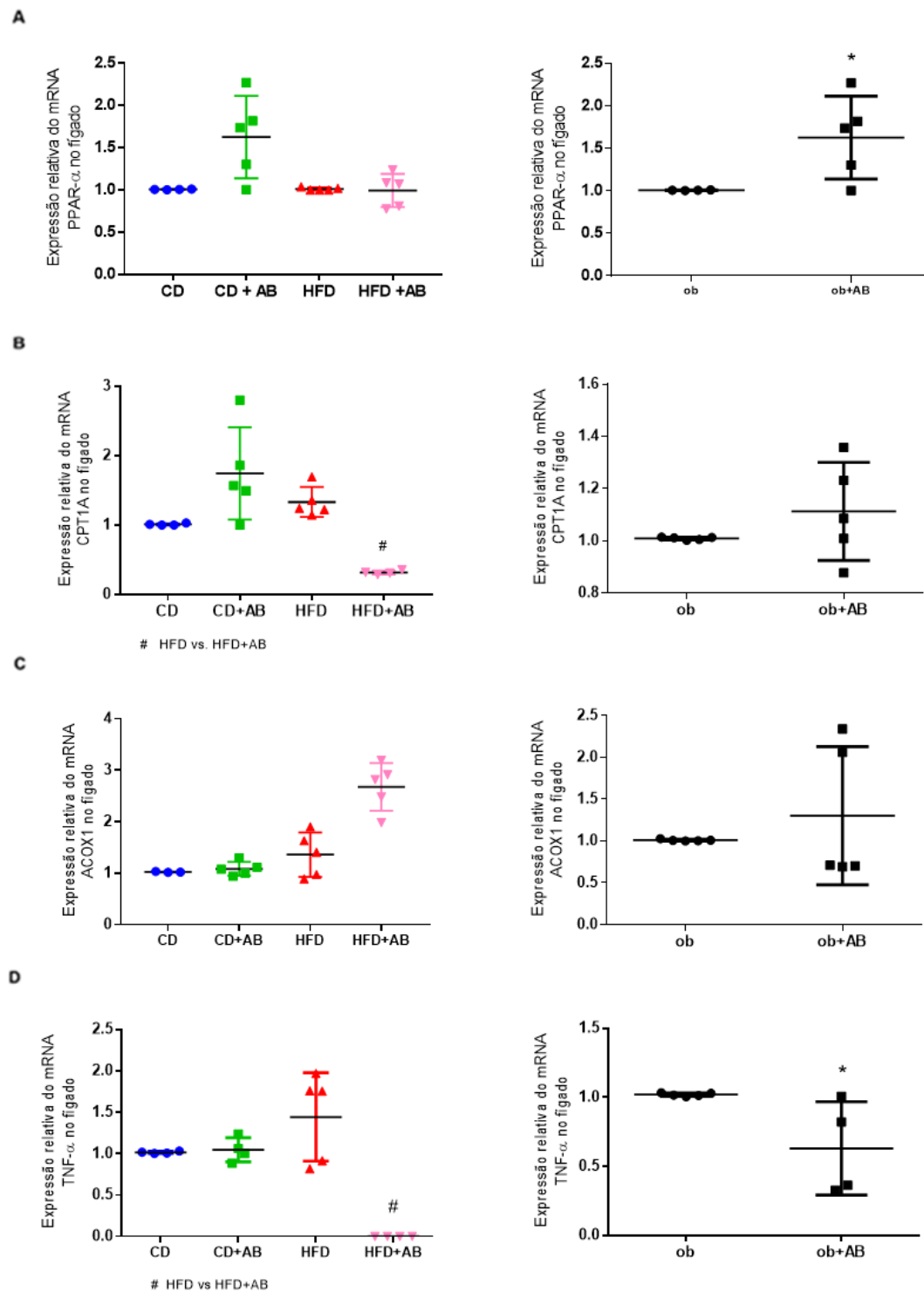


Figura 11 – Expressão relativa do mRNA do gene que codifica (A) PPAR- $\alpha$ , (B) CPT1- $\alpha$ , (C) ACOX1 e (D) TNF- $\alpha$  no fígado. Dados apresentados como média  $\pm$  EPM e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn,  $p < 0,05$  \*,  $p < 0,01$  \*\*.  $n=3-5$  camundongos por grupo. Os resultados foram normalizados pelos níveis de RNAm de  $\beta$ -actina. A quantificação relativa de cada gene alvo foi obtida por meio do método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . CD: dieta controle, HFD: dieta hiperlipídica, AB: antibióticos.



## 5.7 EFEITO DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM ANTIBIÓTICOS SOBRE CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO FÍGADO

Foram avaliadas, de forma qualitativa, as características histológicas do tecido hepático dos camundongos submetidos aos diferentes tratamentos. A avaliação qualitativa do tamanho dos hepatócitos e acúmulo de lipídios dos cortes histológicos, não indicou diferença entre os grupos alimentados com CD e HFD (Figura 12).

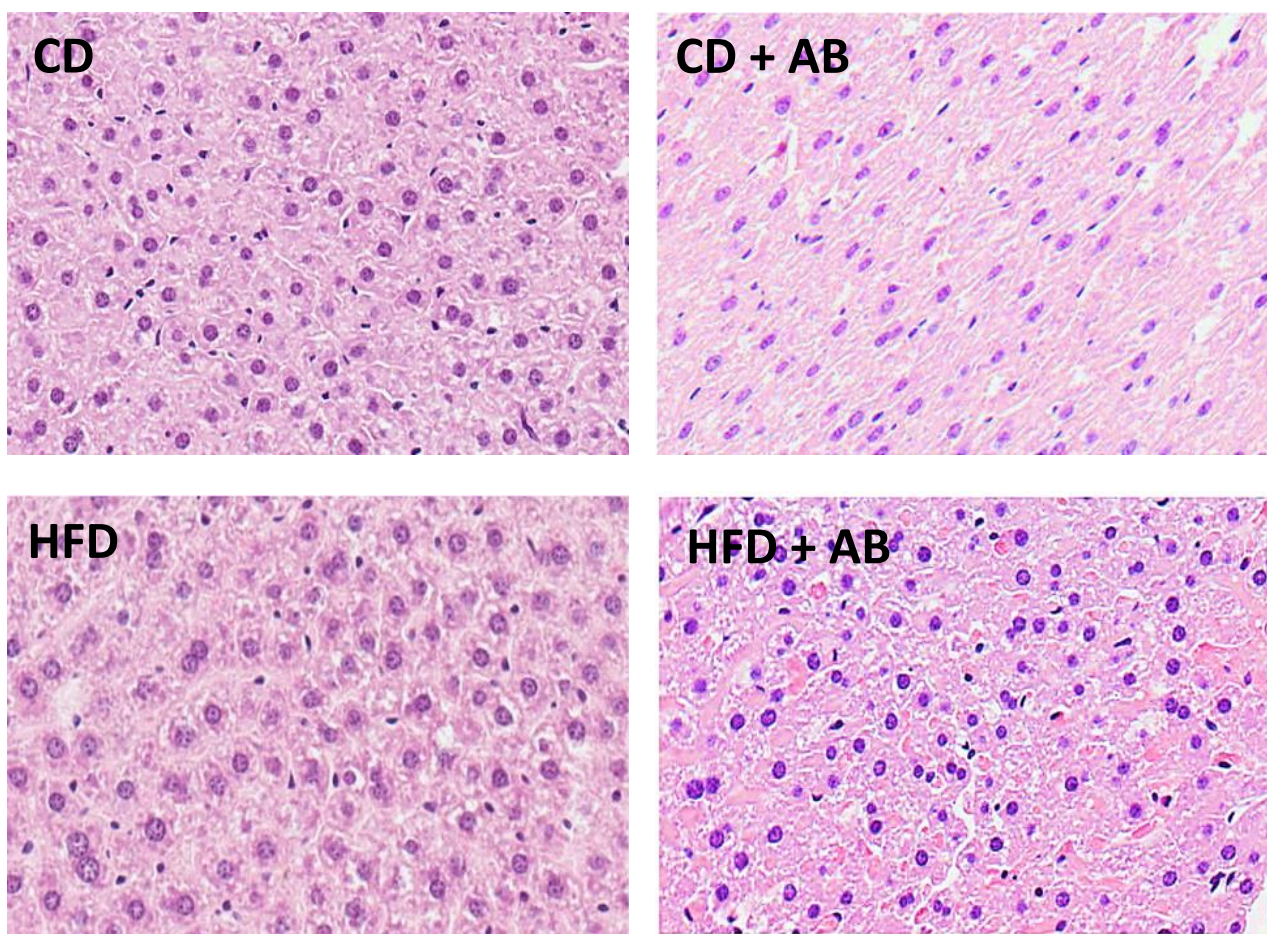


Figura 12 – Características histológicas do fígado de camundongos CD, CD+AB, HFD e HFD+AB. Coloração com hematoxilina e eosina. Aumento de 20X e escala de 100 micrometros. CD: dieta controle, HFD: dieta hiperlipídica, AB: antibióticos. Imagem de um animal, representativa de cada grupo experimental.

## 6 DISCUSSÃO

Diversos estudos mostram o efeito da HFD sobre a composição da microbiota intestinal, caracterizado por disbiose e consequente inflamação, com elevação dos níveis de endotoxina no lúmen intestinal, aumento da permeabilidade intestinal e da razão Firmicutes/Bacteroidetes (Kim et al., 2012; Murphy et al., 2015; Ravussin et al., 2012). No presente estudo, observamos que a microbiota intestinal foi modulada tanto pela dieta, quanto pelo tratamento com antibióticos, e que a alimentação com HFD desencadeou a mudança da composição da microbiota intestinal tipicamente associada à obesidade, com aumento da razão Firmicutes/Bacteroidetes.

Em relação à representação de determinadas espécies bacterianas, nos animais alimentados com CD a *Akkermansia muciniphila*, filo Verrucomicrobia, foi a mais prevalente, porém o tratamento com antibióticos extinguiu a presença dessa bactéria. A obesidade está associada à menor abundância de *Akkermansia muciniphila* na microbiota intestinal, quando comparada ao estado nutricional eutrófico, em camundongos e humanos. Anhê & Marette, (2017) mostraram que o uso da *Akkermansia muciniphila* como probiótico aumenta a capacidade dessa bactéria de reduzir a massa gorda e a síndrome metabólica em camundongos com obesidade induzida por dieta. Assim, esta espécie apresenta propriedades benéficas contra a obesidade e a resistência à insulina, sendo associada a um estado metabólico mais saudável.

*Lactobacillus murinus* é um membro nativo da microbiota intestinal de camundongos e ratos, e não é alterada pela alimentação com HFD (Harley et al., 2013). Este achado é semelhante aos nossos resultados, em que não houve diminuição da prevalência de *Lactobacillus murinus* nos grupos CD e HFD. Entretanto, nos animais alimentados com CD e tratados com antibióticos, foi maior a prevalência de *Lactobacillus reuteri*, que possui efeito imunomodulador (He et al., 2019).

No grupo CD, outra espécie predominante no filo Firmicutes foi *Clostridium leptum*, associada a efeitos anti-inflamatórios no trato gastrointestinal e significativamente reduzido na microbiota fecal de pacientes com doença de Crohn e colite ulcerativa (Kabeerdoss et al., 2013). No filo Bacteroidetes, houve predominância das espécies *Parabacteroides goldsteinii* e *Bacteroides xylanisolvens*. A primeira é uma bactéria cuja representação é reduzida em camundongos alimentados com HFD, e que é associada ao aumento da termogênese no tecido adiposo, a melhora da integridade intestinal e a redução da inflamação e resistência à insulina

(Wu et al., 2019), e que é considerada sem virulência e segura para uso alimentar e como probiótico (Guo et al., 2016).

Os grupos tratados com antibióticos tiveram presença de apenas dois filos, Firmicutes e Proteobacteria, ao final do tratamento. Após a ingestão de antibióticos há uma modificação drástica da microbiota intestinal, caracterizada por diminuição em longo prazo de sua diversidade geral (Manichanh et al., 2010). Os grupos CD+AB e HFD+AB tiveram maior representação da bactéria *Helicobacter bilis*, do filo Proteobacteria, que está associada a lesões hepáticas em camundongos (Franklin et al., 1998; Fox 2004). Em relação ao filo Firmicutes, no grupo CD+AB, além do *Lactobacillus reuteri* houve grande presença de *Pediococcus pentosaceus*, associada a atividade imunomoduladora (Osmanagaoglu et al., 2013). No grupo HFD+AB foi observada maior frequência das bactérias *Streptococcus thermophilus*, um probiótico que está associado à melhor digestão da lactose (Fernandez et al., 2018) e *Lactococcus lactis*, que constitui um probiótico que inibe a proliferação de células cancerígenas e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Han et al., 2015).

O grupo HDF teve maior frequência de *Clostridium coccoides*, no filo Firmicutes, uma espécie cuja representação aumenta em pacientes com esteato-hepatite não alcoólica (Mouzaki et al., 2013). Nos filos Bacteroidetes e Actinobacteria as espécies mais prevalentes foram *Bacteroides intestinalis* e *Enterorhabdus mucosicola*, respectivamente, espécies comuns na microbiota intestinal de camundongos (Bakir et al., 2006; Clavel et al., 2009).

Os animais alimentados com HFD, tratados ou não, tiveram aumento de peso em relação aos animais que receberam dieta CD. O grupo HFD+AB teve o maior ganho de peso em relação aos outros grupos. O tratamento com antibióticos elevou o peso de animais em ambas dietas, mas só foi significativamente diferente no grupo HFD+AB. Em concordância com estes achados, no estudo de Cho et al (2012) a administração de antibioticoterapia subterapêutica aumentou a adiposidade em camundongos jovens, sugerindo que a modulação da microbiota intestinal por antibióticos gera mudanças na composição da microbiota intestinal e composição corporal.

A ingestão de energia não foi modificada nos camundongos alimentados com dieta normolipídica ou hiperlipídica, com ou sem tratamento com antibióticos. Entretanto, a ingestão hídrica foi significativamente diminuída nos animais alimentados com HFD, como demonstrado em outro estudo (de Melo et al., 2009). Alguns estudos já relataram que a ingestão de água tem sido sugerida como uma estratégia para reduzir a ingestão de alimentos, diminuindo a fome e aumentando a saciedade (Kral & Rolls, 2004; Dennis et al., 2010).

O tratamento com antibiótico nos animais alimentados com CD promoveu melhora da tolerância a glicose, em relação ao grupo alimentado com CD e não tratado com antibióticos. Rodrigues et al (2017) mostraram que o tratamento com antibióticos em camundongos saudáveis afeta o metabolismo sistêmico da glicose através da formação de comunidades microbianas intestinais, regulação da expressão gênica no intestino e no fígado. Essas modificações, por sua vez, foram associadas a melhora da tolerância à glicose em camundongos magros.

Diferentemente, não houve diferença da tolerância à glicose entre os grupos alimentados com HFD e tratados ou não com antibióticos. Alguns estudos sugerem que a modulação da microbiota intestinal por antibióticos na obesidade pode melhorar a sinalização da insulina e a tolerância à glicose, reduzindo os níveis circulantes de LPS e a sinalização inflamatória, alterando a expressão de genes hepáticos e intestinais envolvidos na inflamação e metabolismo, o estado hormonal, inflamatório e metabólico do hospedeiro (Carvalho et al., 2012; Membrez et al., 2008). Renata et al (2017) avaliaram os efeitos de probióticos (*Lactobacillus rhamnosus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium bifidumi*) na microbiota intestinal de camundongos Swiss alimentados com dieta rica em gordura ou controle. Os animais tiveram as características relacionadas à obesidade, induzidas pela dieta rica em gordura (alteração da microbiota intestinal, aumento da permeabilidade intestinal, diminuição da tolerância à glicose e comportamento hiperfágico), revertidas por alterações do perfil da microbiota intestinal induzida por probióticos. Os probióticos também induziram uma melhora na resistência hipotalâmica à insulina e à leptina.

Quanto aos parâmetros bioquímicos, a concentração circulante de colesterol total e colesterol HDL aumentaram nos animais alimentados com HFD em relação aos alimentados com CD, como já descrito anteriormente (Hayek et al., 1993), e este aumento não foi modificado pelo tratamento com antibióticos. Não houve modificação significativa dos níveis de triglicerídeos, ALT e AST nos grupos alimentados com diferentes dietas, tratados ou não com antibióticos, embora tenha havido tendência de redução destes parâmetros nos animais alimentados com HFD, em relação àqueles alimentado com CD, dado que contrasta com o que é previamente descrito na literatura (Fraulob et al., 2009). É possível que, nos camundongos estudados, a alimentação com a HFD não tenha sido suficiente para desencadear alterações inflamatórias hepáticas suficientes para elevar a concentração circulante de transaminases. Em consistência, não foram observadas alterações significativas das características histológicas do fígado em resposta à dieta, no presente estudo.

Nos testes comportamentais, os animais não apresentaram diferença na atividade locomotora, avaliada pelo Teste de Campo Aberto. A redução observada no comportamento locomotor ou exploratório após o primeiro dia de teste é natural e é conhecida como habituação (Bolivar, 2009). No teste de Reconhecimento de Objeto, observamos que tanto o grupo HFD, bem como com o grupo CD+AB, apresentaram déficit cognitivo evidenciado pelo teste, representado pela incapacidade de reconhecer o objeto novo. Nossos dados estão de acordo com estudos anteriores que mostram que a HFD prejudica a função cognitiva de camundongos (Fu et al., 2016). Da mesma forma, estudos prévios mostram que a modulação da microbiota intestinal com antibióticos é capaz de alterar a função cognitiva de animais alimentados com dieta controle. O estudo de Fröhlich et al (2016) mostrou que o tratamento de camundongos C57BL/6 machos, alimentados com dieta controle, com antibióticos, prejudicou a memória de reconhecimento em camundongos, enquanto a aprendizagem espacial e a memória permaneceram intactas. Este déficit cognitivo foi associado com as alterações específicas da região do cérebro na expressão das moléculas de sinalização relevantes para a função cognitiva, particularmente a diminuição do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), que desempenha um papel na plasticidade sináptica e na cognição, e o aumento do neuropéptido Y. Hoban et al. (2016) demonstraram que ratos Sprague Dawley adultos alimentados com dieta controle e tratados cronicamente com antibióticos (13 semanas de tratamento) apresentaram depleção da microbiota intestinal que foi associada com a ocorrência de déficits na memória espacial, aumento da sensibilidade visceral e comportamentos semelhantes à depressão. Encontraram, ainda, diminuição da concentração de serotonina no SNC, dos níveis de mRNA do hormônio liberador da corticotrofina (CRH), do receptor de glicocorticoide e também da expressão do BDNF.

No presente estudo, os grupos CD e HFD+AB apresentaram função cognitiva preservada, ao reconhecer o objeto novo. Assim, o tratamento dos animais alimentados com HFD com antibióticos, com modificações do padrão obesogênico original da microbiota associada à HFD, reverteu o dano cognitivo. Soto et al. (2018) mostrou que modificações no microbioma intestinal de camundongos obesos provocam mudanças no comportamento do hospedeiro, revertendo anormalidades comportamentais/de humor, onde os níveis de triptofano, que são aumentados pela HFD, voltou aos níveis normais com o tratamento com antibióticos. Também observaram um aumento de duas vezes nos níveis de proteínas BDNF após 6 semanas de HFD em comparação com os camundongos alimentados com CD, e isso foi revertido com o tratamento antibióticos. Esses efeitos foram reversíveis quando os antibióticos foram

interrompidos e transferidos para camundongos sem germes por transferência bacteriana cecal. Entretanto, o uso de antibióticos foi associado a declínio cognitivo (Sarkar et al., 2018) em animais alimentados com dieta controle. Cabe ressaltar que os tipos de antibióticos, dose e tempo de tratamento, utilizados em nosso protocolo experimental tiveram o objetivo de modular a microbiota intestinal, e não de depletá-la como é o objetivo comum de vários estudos.

No teste de suspensão pela cauda, usado para avaliar o comportamento depressivo, nenhum dos grupos teve aumento da imobilidade, indicando que a tanto a dieta quanto a modulação da microbiota intestinal com antibióticos não induziram comportamento tipo-depressivo nos animais. Diferentemente de nossos dados, outros estudos observaram que a exposição à dieta HFD (Bridgewater et al., 2017) e tratamento com antibióticos (Guida et al., 2018) aumentaram o tempo de imobilidade de animais, com efeitos ansiogênicos. Estes mesmos estudos indicaram que mudanças da microbiota intestinal induzidas pela dieta foram associadas a modificações de vias de sinalização importantes para regulação da função cognitiva, como diminuição da expressão de BDNF no hipocampo e alterações na plasticidade sináptica, que têm mostrado contribuir fortemente para o desenvolvimento da depressão e influenciam o comportamento.

Assim como a modulação da microbiota intestinal por antibióticos altera o fenótipo comportamental, o uso de probióticos também está associado com alterações no comportamento, mas de forma positiva. Ait-Belgnaoui et al. (2014) mostraram que uma formulação de probióticos (*Lactobacillus helveticus* e *Bifidobacterium longum*) apresenta atividade ansiolítica e redução a apoptose no sistema linfático em modelos animais de depressão. Savignac et al. (2015) alimentaram camundongos BALB/C machos com *Bifidobacteria longum* e *B. breve* e avaliaram seu comportamento. Os animais que receberam probióticos discriminaram o objeto novo mais rapidamente do que os animais controle, sugerindo melhor aprendizado. Mudar a composição da microbiota, por meio da administração de probióticos, parece ser uma opção terapêutica viável para modular a fisiologia e o comportamento intestinal, e pode melhorar a qualidade de vida em certas populações de pacientes (Gareau, 2014).

Observamos que o tratamento com antibióticos nas dietas CD e HFD alteraram o metabolismo lipídico no fígado de camundongos. O gene que codifica o receptor PPAR- $\alpha$ , um sensor para alterações nos níveis de ácidos graxos e receptor chave para ativação da via de  $\beta$ -oxidação (Burri et al., 2010), teve aumento não significativo de sua expressão nos animais CD+AB e aumento significativo nos animais ob+AB. Dados de estudos prévios indicam que

após a exposição a LPS, um modelo que simula a disbiose intestinal em alguns aspectos, há supressão significativa da expressão do gene que codifica o PPAR- $\alpha$  no fígado de camundongos (Oshida et al., 2015; Mohapatra et al., 2010). É possível, assim, que o tratamento com antibióticos diminui a exposição de LPS nos animais tratados.

Estudamos também alguns genes responsivos a PPAR- $\alpha$ , relacionados a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, como os que codificam a acil-CoA oxidase (ACOX1) e a carnitina Palmitoil Transferase I (CPT1- $\alpha$ ). A expressão de PPAR- $\alpha$ , um receptor nuclear expresso em tecidos com alta atividade oxidativa que desempenha um papel central no metabolismo (Montager et al., 2016) teve aumento não significativo no grupo CD tratado com antibióticos e aumento significativo no grupo ob tratado com antibióticos, sugerindo um efeito dos antibióticos na expressão desse gene. A expressão de *Cpt1a*, transcrito do gene que codifica a enzima que catalisa a de oxidação de ácidos graxos de cadeia longa dentro das mitocôndrias (Begrache et al., 2011), teve aumento não significativo no grupo CD+AB e diminuição significativa no grupo HFD+AB. O gene que codifica a ACOX1, enzima que limita a taxa na  $\beta$ -oxidação do ácido graxo de cadeia longa nos peroxissomos, é ativado por grande quantidade de gorduras na dieta, resultando em aumento da síntese das enzimas responsáveis pela beta-oxidação nos peroxissomos no fígado (Moreno-Fernandez et al., 2018). Em concordância, nossos resultados também indicaram aumento da expressão do gene que codifica a ACOX1 nos animais alimentados com dieta HFD, com diferença estatística no grupo HFD+AB e tendência de aumento nos grupos HFD e ob+AB. Assim, presume-se que o tratamento com antibióticos em animais alimentados com dieta CD esteja associado a ativação da via de  $\beta$ -oxidação nas mitocôndrias, enquanto nos animais tratados com antibióticos e alimentados com HFD, essa ativação se daria nos peroxissomos.

A expressão do TNF- $\alpha$ , citocina pró-inflamatória que é estimulada por LPS (Salim et al., 2016), teve sua expressão (mRNA) aumentada no fígado do grupo HFD e diminuída significativamente do fígado dos grupos HFD+AB e ob+AB, dados semelhantes aos descritos previamente na literatura, que indicam que a HFD, obesidade e resistência à insulina estão associadas ao aumento da expressão do TNF- $\alpha$  (Hotamisligil et al., 1996) e que o tratamento com antibióticos diminui a expressão de TNF- $\alpha$  no fígado (Lankelma et al., 2016; Ekmekciu et al., 2017). Em conjunto, esses achados reforçam que o tratamento com antibióticos modula a microbiota intestinal e reduz a exposição de LPS.

A análise histológica do fígado dos camundongos não mostrou diferenças entre os grupos, mesmo nos animais alimentados com dieta HFD, que é conhecida por induzir DHGNA

(Nakamura & Terauchi., 2013). Isso pode estar relacionado a diminuição dos triglicerídeos, ALT e AST, mesmo num contexto em que tenha havido ganho de peso e resistência à insulina, porém não DHGNA como esperado. Embora este achado precise ser melhor explorado, é possível que se deva a características específicas dos camundongos empregados no presente estudo, que apresentaram sensibilidade diferencial aos diferentes desfechos reconhecidamente induzidos pela HFD.

Como limitações do estudo, destacam-se o pequeno número amostral por grupo e a ausência de alguns desfechos esperados, induzidos pela dieta hiperlipídica. Estes últimos podem ter comprometido o reconhecimento dos efeitos da modulação da microbiota intestinal no modelo de obesidade empregado. Além disso, o modelo empregado no presente estudo, de modulação da microbiota intestinal por antibióticos, não é considerado definitivo na definição de causalidade entre as alterações da microbiota intestinal e os desfechos observados no hospedeiro.

Em conclusão, a dieta hiperlipídica causou alterações da composição da microbiota intestinal que podem estar envolvidas na disfunção cognitiva, na medida em que houve reversão desta disfunção em resposta à modulação da microbiota intestinal com antibióticos. Esses achados constituem mais um indício da associação entre a composição da microbiota intestinal e a função cognitiva do hospedeiro, porém, como comentado anteriormente, precisam ser confirmados por modelos que estabeleçam a causalidade da associação.



## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo avaliou o efeito da administração de antibióticos para modulação da microbiota intestinal de camundongos C57BL/6 machos, alimentados com dieta normo ou hiperlipídica, onde:

- A composição da microbiota intestinal, avaliada pela sequência do gene 16S rRNA em DNA extraído de amostras fecais, foi significativamente alterada pela dieta HFD e tratamento com antibióticos.
- A HFD e o tratamento com antibióticos aumentaram o peso e diminuiu a ingestão hídrica, mas não modificaram a ingestão de energia.
- Os grupos alimentados com HFD (HFD e HFD+AB) apresentaram piora da tolerância à glicose e o tratamento com antibióticos não alterou a resposta. Nos animais alimentados com dieta CD, o tratamento com antibióticos melhorou a tolerância à glicose.
- No Teste de Reconhecimento de Objeto, tanto a HFD como com a administração de antibióticos para animais alimentados com CD induziram déficit cognitivo, representado pela incapacidade de reconhecer o objeto novo. O tratamento com antibióticos reverteu o déficit cognitivo induzido pela HFD.
- A dieta e o tratamento não induziram comportamento tipo-depressivo, avaliado pelo Teste de Suspensão pela Cauda.
- A expressão de genes relacionados à oxidação de ácidos graxos e processo inflamatório no fígado foram alteradas pela dieta ou tratamento com antibióticos.
- A dieta HFD e o tratamento com antibióticos não alteraram as características histológicas do tecido hepático.

## 8 CONCLUSÃO

A administração de HFD para camundongos induziu obesidade e piorou a tolerância à glicose, e alterou expressivamente a composição da microbiota intestinal. O tratamento com antibióticos melhorou a tolerância à glicose nos animais alimentados com dieta normolipídica e modificou significativamente a composição da microbiota intestinal.

Em associação com a modificação da composição da microbiota intestinal, o tratamento com antibióticos reverteu o déficit cognitivo induzido pela HFD, embora tenha piorado a função cognitiva de camundongos alimentados com dieta controle.

A modulação da microbiota intestinal com antibióticos também modificou a expressão de genes relacionados à oxidação de ácidos graxos e sinalização inflamatória no fígado de camundongos alimentados com HFD, sugerindo que a microbiota possa influenciar o metabolismo lipídico hepático.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-Shanab, A; Quigley, E.M.M. The role of the gut microbiota in nonalcoholic fatty liver disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, v. 7, n. 12, p. 691, 2010.
- Agustí, A. et al. Interplay between the gut-brain axis, obesity and cognitive function. *Frontiers in neuroscience*, v. 12, p. 155, 2018.
- Ait-Belgnaoui, A. et al. Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice. *Neurogastroenterology & Motility*, v. 26, n. 4, p. 510-520, 2014.
- Anhê, F.F.; Marette, A. A microbial protein that alleviates metabolic syndrome. *Nature medicine*, v. 23, n. 1, p. 11, 2017.
- Arslan, N. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, v. 20, n. 44, p. 16452, 2014.
- Asterholm, Ingrid Wernstedt et al. Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling. *Cell metabolism*, v. 20, n. 1, p. 103-118, 2014.
- Attuquayefio, T. et al. A four-day Western-style dietary intervention causes reductions in hippocampal-dependent learning and memory and interoceptive sensitivity. *PloS one*, v. 12, n. 2, p. e0172645, 2017.
- Bakir, Mohammad Abdul et al. *Bacteroides intestinalis* sp. nov., isolated from human faeces. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 56, n. 1, p. 151-154, 2006.
- Baym, C.L. et al. Dietary lipids are differentially associated with hippocampal-dependent relational memory in prepubescent children. *The American journal of clinical nutrition*, v. 99, n. 5, p. 1026-1032, 2014.
- Begrliche, Karima et al. Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *Journal of hepatology*, v. 54, n. 4, p. 773-794, 2011.
- Beilharz, J.E.; Maniam, J.; Morris, M.J. Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats. *Brain, behavior, and immunity*, v. 37, p. 134-141, 2014.
- Bell, D.S.H. Changes seen in gut bacteria content and distribution with obesity: causation or association?. *Postgraduate medicine*, v. 127, n. 8, p. 863-868, 2015.
- Bolivar, V.J. Intrasession and intersession habituation in mice: from inbred strain variability to linkage analysis. *Neurobiology of learning and memory*, v. 92, n. 2, p. 206-214, 2009.
- Boulangé, C.L. et al. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome medicine*, v. 8, n. 1, p. 42, 2016.
- Braniste, V. et al. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Science translational medicine*, v. 6, n. 263, p. 263ra158-263ra158, 2014.

Brasil, Ministério da Ciência e Tecnologia, CONCEA. Diretriz brasileira para o cuidado ea utilização de animais para fins científicos e didáticos–DBCA. 2013.

Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. 2018.

Bridgewater, Laura C. et al. Gender-based differences in host behavior and gut microbiota composition in response to high fat diet and stress in a mouse model. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 10776, 2017.

Brocardo, P.S. et al. Folic acid administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Neuropharmacology*, v. 54, n. 2, p. 464-473, 2008.

Bugianesi, E.; Mccullough, A.J.; Marchesini, G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology*, v. 42, n. 5, p. 987-1000, 2005.

Burri, Lena; THORESEN, G. Hege; BERGE, Rolf K. The role of PPAR activation in liver and muscle. *PPAR research*, v. 2010, 2010.

Carlson, A.L. et al. Infant gut microbiome associated with cognitive development. *Biological psychiatry*, v. 83, n. 2, p. 148-159, 2018.

Carvalho, J.B.C et al. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS letters*, v. 500, n. 3, p. 119-124, 2001.

Carvalho, B. M. et al. Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. *Diabetologia*, v. 55, n. 10, p. 2823-2834, 2012.

CFMV. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Guia de boas práticas para eutanásia de animais: conceitos e procedimentos recomendados. In: *Veterinária CFdM*, editor. 2013.

Chalasani, N. et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*, v. 55, n. 6, p. 2005-2023, 2012.

Cho, Ilseung et al. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature*, v. 488, n. 7413, p. 621, 2012.

Christoff, A.P. et al. Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. *Neoprosecta Microbiome Technologies*. 2017.

Clark, R.E. et al. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, v. 20, n. 23, p. 8853-8860, 2000.

Clavel, Thomas et al. Isolation of bacteria from the ileal mucosa of TNFdeltaARE mice and description of *Enterorhabdus mucosicola* gen. nov., sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 59, n. 7, p. 1805-1812, 2009.

Cryan, J.F.; Dinan, T.G. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature reviews neuroscience*, v. 13, n. 10, p. 701, 2012.

De Melo, C.L. et al. Betulinic acid, a natural pentacyclic triterpenoid, prevents abdominal fat accumulation in mice fed a high-fat diet. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 57, n. 19, p. 8776-8781, 2009.

Dennis, E.A. et al. Water consumption increases weight loss during a hypocaloric diet intervention in middle-aged and older adults. *Obesity*, v. 18, n. 2, p. 300-307, 2010.

Dinan, T.G.; Cryan, J.F. Melancholic microbes: a link between gut microbiota and depression?. *Neurogastroenterology & Motility*, v. 25, n. 9, p. 713-719, 2013.

dos Santos, L.C., Torrent, I.F.. O tecido adiposo e a produção de adipocinas. *SYNTHESIS|Revista Digital FAPAM*, v. 2, n. 2, p. 110-119, 2016.

Ekmekciu, Ira et al. Immune responses to broad-spectrum antibiotic treatment and fecal microbiota transplantation in mice. *Frontiers in immunology*, v. 8, p. 397, 2017.

Elias, I. et al. Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*, v. 61, n. 7, p. 1801-1813, 2012.

Fernandez, Neiké et al. Characterization of mucus-related properties of *Streptococcus thermophilus*: from adhesion to induction. *Frontiers in physiology*, v. 9, 2018.

Flint, H.J. et al. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 74, n. 1, p. 13-22, 2015.

Foster, J.A.; Rinaman, L., Cryan, John F. Stress & the gut-brain axis: regulation by the microbiome. *Neurobiology of stress*, v. 7, p. 124-136, 2017.

Fox, James G. et al. *Helicobacter bilis*-associated hepatitis in outbred mice. *Comparative medicine*, v. 54, n. 5, p. 571-577, 2004.

Franklin, Craig L. et al. Enterohepatic lesions in SCID mice infected with *Helicobacter bilis*. *Comparative Medicine*, v. 48, n. 4, p. 334-339, 1998.

Fraulob, Julio C. et al. A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease (NAFPD) in C57BL/6 mice fed a high fat diet. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, p. 1004080019-1004080019, 2010.

Friedrich, M. J. Global obesity epidemic worsening. *Jama*, v. 318, n. 7, p. 603-603, 2017.

Fröhlich, E.E. et al. Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: analysis of gut microbiota-brain communication. *Brain, behavior, and immunity*, v. 56, p. 140-155, 2016.

Fu, Zhuo Et Al. Long-term high-fat diet induces hippocampal microvascular insulin resistance and cognitive dysfunction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2016.

Gareau, M.G.; Sherman, P.M.; Walker, W.A. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, v. 7, n. 9, p. 503, 2010.

Gareau, M.G. Microbiota-gut-brain axis and cognitive function. In: *Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease*. Springer, New York, NY, 2014. p. 357-371.

Gérard, P. Gut microbiota and obesity. *Cellular and molecular life sciences*, v. 73, n. 1, p. 147-162, 2016.

Gibson, E.L; Barr, S.; Jeanes, Y.M. Habitual fat intake predicts memory function in younger women. *Frontiers in human neuroscience*, v. 7, p. 838, 2013.

Goossens, Gijss H. The metabolic phenotype in obesity: fat mass, body fat distribution, and adipose tissue function. *Obesity facts*, v. 10, n. 3, p. 207-215, 2017.

Greco S.J., Bryan K.J., Sarkar .S, Zhu X., Smith M.A., Ashford J.W., Johnston J.M., Tezapsidis N., Casadesus G. Leptin reduces pathology and improves memory in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2010; 19(4):1155-1167.

Gregor, M. F., & Hotamisligil, G. S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annual Review of Immunology*, 29(1), 415–445. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101322. 2011.

Greiner,T, & Bäckhed, F. Effects of the gut microbiota on obesity and glucose homeostasis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 22, n. 4, p. 117-123, 2011.

Grover, M.; Kashyap, P.C. Germ-free mice as a model to study effect of gut microbiota on host physiology. *Neurogastroenterology & Motility*, v. 26, n. 6, p. 745-748, 2014.

Guida, F. et al. Antibiotic-induced microbiota perturbation causes gut endocannabinoidome changes, hippocampal neuroglial reorganization and depression in mice. *Brain, behavior, and immunity*, v. 67, p. 230-245, 2018.

Guillemot-Legris, O; Muccioli, G.G. Obesity-induced neuroinflammation: beyond the hypothalamus. *Trends in Neurosciences*, v. 40, n. 4, p. 237-253, 2017.

Guo, Zhuang et al. Intestinal microbiota distinguish gout patients from healthy humans. *Scientific reports*, v. 6, p. 20602, 2016.

Han, Kyoung Jun et al. Anticancer and anti-inflammatory activity of probiotic *Lactococcus lactis* NK34. *Journal of microbiology and biotechnology*, v. 25, n. 10, p. 1697-1701, 2015.

Harakeh, S.M. et al. Gut microbiota: a contributing factor to obesity. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 6, p. 95, 2016.

Harley, Isaac TW et al. Differential colonization with segmented filamentous bacteria and *Lactobacillus murinus* do not drive divergent development of diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Molecular metabolism*, v. 2, n. 3, p. 171-183, 2013.

Hayek, T. et al. Dietary fat increases high density lipoprotein (HDL) levels both by increasing the transport rates and decreasing the fractional catabolic rates of HDL cholesterol ester and apolipoprotein (Apo) AI. Presentation of a new animal model and mechanistic studies in human Apo AI transgenic and control mice. *The Journal of clinical investigation*, v. 91, n. 4, p. 1665-1671, 1993.

Haynes, B.A. et al. Isolation, Expansion, and Adipogenic Induction of CD34+ CD31+ Endothelial Cells from Human Omental and Subcutaneous Adipose Tissue. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. 137, p. e57804, 2018.

He, Jiayi et al. Effect of *Lactobacillus reuteri* on intestinal microbiota and immune parameters: Involvement of sex differences. *Journal of Functional Foods*, v. 53, p. 36-43, 2019.

Hoban, A.E. et al. Behavioural and neurochemical consequences of chronic gut microbiota depletion during adulthood in the rat. *Neuroscience*, v. 339, p. 463-477, 2016.

Hotamisligil, Gökhan S. et al. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ -and obesity-induced insulin resistance. *Science*, v. 271, n. 5249, p. 665-670, 1996.

Houseknecht, K. L.; Portocarrero, C. P. Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. *Domestic animal endocrinology*, v. 15, n. 6, p. 457-475, 1998.

Hruby, A; HU, F.B. The epidemiology of obesity: a big picture. *Pharmacoeconomics*, v. 33, n. 7, p. 673-689, 2015.

Hurt, R.T. et al. Obesity epidemic: overview, pathophysiology, and the intensive care unit conundrum. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, v. 35, p. 4S-13S, 2011.

Illumina 16S metagenomic sequencing library preparation (Illumina Technical Note 15044223 Rev.B). Illumina. Disponível em: < [https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf) > (2017). Acesso em: 16 de janeiro de 2019.

Kabeerdoss, Jayakanthan et al. *Clostridium leptum* group bacteria abundance and diversity in the fecal microbiota of patients with inflammatory bowel disease: a case-control study in India. *BMC gastroenterology*, v. 13, n. 1, p. 20, 2013.

Kaidanovich-Beilin, O.; Cha, D.S.; McIntyre, R.S. Crosstalk between metabolic and neuropsychiatric disorders. *F1000 biology reports*, v. 4, 2012.

Kanoski, S.E.; Davidson, T.L. Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiology & behavior*, v. 103, n. 1, p. 59-68, 2011.

Kim, Kyung-Ah et al. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PloS one*, v. 7, n. 10, p. e47713, 2012.

Kivipelto, M. et al. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *Bmj*, v. 322, n. 7300, p. 1447-1451, 2001.

- Komulainen, P. et al. Metabolic syndrome and cognitive function: a population-based follow-up study in elderly women. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, v. 23, n. 1, p. 29-34, 2007.
- Kral, T.V.E & Rolls, B.J. Energy density and portion size: their independent and combined effects on energy intake. *Physiology & behavior*, v. 82, n. 1, p. 131-138, 2004.
- Kushner, R.F. Weight loss strategies for treatment of obesity. *Progress in cardiovascular diseases*, v. 56, n. 4, p. 465-472, 2014.
- Lach, G. et al. Envolvimento da flora intestinal na modulação de doenças psiquiátricas. *VITTALLE-Revista de Ciências da Saúde*, v. 29, n. 1, p. 64-82, 2017.
- Lankelma, Jacqueline M. et al. Antibiotic-induced gut microbiota disruption decreases TNF- $\alpha$  release by mononuclear cells in healthy adults. *Clinical and translational gastroenterology*, v. 7, n. 8, p. e186, 2016.
- Large, V. et al. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes & metabolism*, v. 30, n. 4, p. 294-309, 2004.
- Lee, Byung-Cheol; Lee, Jongsoo. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, v. 1842, n. 3, p. 446-462, 2014.
- Leger et al. Object recognition test in mice. *Nature Protocols*. 2013; v.8 n.12 p. 2531
- Ley, R.E, Turnbaugh, P.J., Klein, S., Gordon, J.I. Human gut microbes associated with obesity. *Nature* volume 444, pages 1022–1023 (2006).
- Luczynski, P. et al. Growing up in a bubble: using germ-free animals to assess the influence of the gut microbiota on brain and behavior. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 19, n. 8, 2016.
- Manichanh, Chaysavanh et al. Reshaping the gut microbiome with bacterial transplantation and antibiotic intake. *Genome research*, v. 20, n. 10, p. 1411-1419, 2010.
- Marazziti, D. et al. Metabolic syndrome and major depression. *CNS spectrums*, v. 19, n. 4, p. 293-304, 2014.
- Marcela, R.J. Características biológicas del tejido adiposo: el adipocito como célula endocrina. *Revista Médica Clínica Las Condes*, v. 23, n. 2, p. 136-144, 2012.
- Mariat, D. et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC microbiology*, v. 9, n. 1, p. 123, 2009.
- Mazzocoli, G. Body composition: Where and when. *European journal of radiology*, v. 85, n. 8, p. 1456-1460, 2016.
- Mcmullen, P.D. et al. A map of the PPAR $\alpha$  transcription regulatory network for primary human hepatocytes. *Chemico-biological interactions*, v. 209, p. 14-24, 2014.



Membrez, Mathieu et al. Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *The FASEB Journal*, v. 22, n. 7, p. 2416-2426, 2008.

Miller, A.A.; Spencer, S.J. Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment. *Brain, behavior, and immunity*, v. 42, p. 10-21, 2014.

Minemura M, Shimizu Y. Gut microbiota and liver diseases. *World J Gastroenterol* 2015; 21(6): 1691-1702.

Mohapatra, Saroj K. et al. Modulation of hepatic PPAR expression during Ft LVS LPS-induced protection from Francisella tularensis LVS infection. *BMC infectious diseases*, v. 10, n. 1, p. 10, 2010.

Monsalve, Francisco A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor targets for the treatment of metabolic diseases. *Mediators of inflammation*, v. 2013, 2013.

Montagner, A., Polizzi, A., Fouché, E., Ducheix, S., Lippi, Y., Lasserre, F., ... & Iroz, A. Liver PPAR $\alpha$  is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against DHGNA. *Gut* 2016;65:1202–1214. doi:10.1136/gutjnl-2015-310798.

Moreno-Fernandez, Maria E. et al. Peroxisomal  $\beta$ -oxidation regulates whole body metabolism, inflammatory vigor, and pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *JCI insight*, v. 3, n. 6, 2018.

Mouzaki, Marialena et al. Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, v. 58, n. 1, p. 120-127, 2013.

Müller, M. J. et al. Beyond the body mass index: tracking body composition in the pathogenesis of obesity and the metabolic syndrome. *Obesity Reviews*, v. 13, p. 6-13, 2012.

Mulvahill, J.S. et al. Effect of Metabolic Syndrome on Late-Life Depression: Associations with Disease Severity and Treatment Resistance. *Journal of the American Geriatrics Society*, v. 65, n. 12, p. 2651-2658, 2017.

Murphy, E. Angela; Velazquez, Kandy T.; Herbert, Kyle M. Influence of high-fat-diet on gut microbiota: A driving force for chronic disease risk. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, v. 18, n. 5, p. 515, 2015.

Nakamura, Akinobu; TERAUCHI, Yasuo. Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD. *International journal of molecular sciences*, v. 14, n. 11, p. 21240-21257, 2013.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Obesity and overweight. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>

Oshida, Keiyu et al. Identification of modulators of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) in a mouse liver gene expression compendium. *PloS one*, v. 10, n. 2, p. e0112655, 2015.

- Osmanagaoglu, Ozlem et al. Immunomodulatory function and in vivo properties of *Pediococcus pentosaceus* OZF, a promising probiotic strain. *Annals of microbiology*, v. 63, n. 4, p. 1311-1318, 2013.
- Ottman, N. et al. The function of our microbiota: who is out there and what do they do?. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 2, p. 104, 2012.
- Panza, F. et al. Metabolic syndrome, mild cognitive impairment and dementia. *Current Alzheimer Research*, v. 8, n. 5, p. 492-509, 2011.
- Pappachan, J. M., Babu, S., Krishnan, B., & Ravindran, N. C. Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Clinical Update. *Journal of clinical and translational hepatology*. 2017; 5(4), 384.
- Peila, R. et al. Joint effect of the APOE gene and midlife systolic blood pressure on late-life cognitive impairment. *Stroke*, v. 32, p. 2882-2889, 2001.
- Pi-Sunyer, X. The medical risks of obesity. *Postgraduate medicine*, v. 121, n. 6, p. 21-33, 2009.
- Prut, L., & Belzung, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*. 2003; 463(1), 3-33.
- Pulkki-Råback, L. et al. Depressive symptoms and the metabolic syndrome in childhood and adulthood: a prospective cohort study. *Health Psychology*, v. 28, n. 1, p. 108, 2009.
- Ràfols, Montserrat Esteve. Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*, v. 61, n. 2, p. 100-112, 2014.
- Rakhshandehroo, M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR research*, v. 2010, 2010.
- Ravussin, Yann et al. Responses of gut microbiota to diet composition and weight loss in lean and obese mice. *Obesity*, v. 20, n. 4, p. 738-747, 2012.
- Reilly SM, Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nature reviews Endocrinology*. 2017;13(11):633-43.
- Renata, A. et al. Probiotics Modulate Gut Microbiota and Improve Insulin Sensitivity in DIO Mice. *Journal of nutritional biochemistry*, 2017.
- Ribeiro Filho, F.F. et al. Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 2006.
- Rodrigues, Richard R. et al. Antibiotic-induced alterations in gut microbiota are associated with changes in glucose metabolism in healthy mice. *Frontiers in microbiology*, v. 8, p. 2306, 2017.
- Russo, R. et al. Gut-brain axis: Role of lipids in the regulation of inflammation, pain and CNS diseases. *Current medicinal chemistry*, v. 25, n. 32, p. 3930-3952, 2018.
- Saad, M. J. A.; Santos, A.; Prada, P. O. Linking gut microbiota and inflammation to obesity and insulin resistance. *Physiology*, v. 31, n. 4, p. 283-293, 2016.

Salim, Taha; SERSHEN, Cheryl L.; MAY, Elebeoba E. Investigating the role of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  activation on the dynamics of iNOS gene expression in LPS stimulated macrophages. *PloS one*, v. 11, n. 6, p. e0153289, 2016.

Saltiel, A.R.; Olefsky, J.M. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *The Journal of clinical investigation*, v. 127, n. 1, p. 1-4, 2017.

Sanmiguel, Claudia; GUPTA, Arpana; MAYER, Emeran A. Gut microbiome and obesity: a plausible explanation for obesity. *Current obesity reports*, v. 4, n. 2, p. 250-261, 2015.

Sarkar, A. et al. The microbiome in psychology and cognitive neuroscience. *Trends in cognitive sciences*, 2018.

Savignac, H. M. et al. Bifidobacteria modulate cognitive processes in an anxious mouse strain. *Behavioural brain research*, v. 287, p. 59-72, 2015.

Sekirov, I. et al. Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*, v. 90, n. 3, p. 859-904, 2010.

Serra-Majem, L; Bautista-Castaño, I. Etiology of obesity: two “key issues” and other emerging factors. *Nutricion hospitalaria*, v. 28, n. 5, 2013.

Shimizu, Y. et al. Role of leptin in conditioned place preference to high-fat diet in leptin-deficient ob/ob mice. *Neuroscience letters*, v. 640, p. 60-63, 2017.

Solas, M. et al. Inflammation and gut-brain axis link obesity to cognitive dysfunction: plausible pharmacological interventions. *Current opinion in pharmacology*, v. 37, p. 87-92, 2017.

Solomon, A. et al. Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, v. 28, n. 1, p. 75, 2009.

Sonnenburg, J.L., Bäckhed, F. Diet–microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature*, v. 535, n. 7610, p. 56, 2016.

Soto, M. et al. Gut microbiota modulate neurobehavior through changes in brain insulin sensitivity and metabolism. *Molecular psychiatry*, v. 23, n. 12, p. 2287, 2018.

Steru, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, v. 85, n. 3, p. 367-370, 1985.

Stolarczyk, Emilie. Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response? *Current opinion in pharmacology*, v. 37, p. 35-40, 2017.

Suez, J. et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*, London, v.0, no. 0, p.1-17, 2014.

Swinburn, B.A. et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *The Lancet*, v. 378, n. 9793, p. 804-814, 2011.

- Tolppanen, A.M. et al. Midlife and late-life body mass index and late-life dementia: results from a prospective population-based cohort. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 38, n. 1, p. 201-209, 2014.
- Tolppanen, A.M. et al. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease: evidence from epidemiological studies. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 32, n. 3, p. 531-540, 2012.
- Torres-Fuentes, C. et al. The microbiota–gut–brain axis in obesity. *The lancet Gastroenterology & hepatology*, v. 2, n. 10, p. 747-756, 2017.
- Trayhurn, P. Adipocyte biology. *Obesity reviews*, v. 8, p. 41-44, 2007.
- Trayhurn, P.; Wood, I.S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *British journal of nutrition*, v. 92, n. 3, p. 347-355, 2004.
- Tremaroli, V. & Bäckhed, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, v. 489, n. 7415, p. 242, 2012.
- Vanhanen, M. et al. Association of metabolic syndrome with Alzheimer disease: a population-based study. *Neurology*, v. 67, n. 5, p. 843-847, 2006.
- Viana, Janice da Costa Silva. Modulação da microbiota intestinal com antibióticos e seus efeitos sobre a hiperglicemia induzida por atorvastatina em camundongos ob/ob. 2018.
- Wang, R., Li, X.N. Different adipose tissue depots and metabolic syndrome in human. *Sheng li xue bao:[Acta physiologica Sinica]*, v. 69, n. 3, p. 357-365, 2017.
- Wang, X. et al. Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16S rDNA sequence analysis. *Journal of applied microbiology*, v. 95, n. 3, p. 508-520, 2003.
- Wu, Tsung-Ru et al. Gut commensal *Parabacteroides goldsteinii* plays a predominant role in the anti-obesity effects of polysaccharides isolated from *Hirsutella sinensis*. *Gut*, v. 68, n. 2, p. 248-262, 2019.
- Yates, K.F. et al. Impact of metabolic syndrome on cognition and brain: a selected review of the literature. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 32, n. 9, p. 2060-2067, 2012.
- Younossi, Zobair M. et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, v. 64, n. 1, p. 73-84, 2016.
- Zhang, P; Tian, B. Metabolic syndrome: an important risk factor for Parkinson's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2014, 2014.

## ANEXO A - DECLARAÇÃO DA CEUA

  
**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 18 de abril de 2017.

**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado "**EFEITO DA MICROBIOTA INTESTINAL SOBRE O RECRUTAMENTO DO ADIPÓCITO BEGE EM CAMUNDONGOS**", Protocolo n.º 3 /2017, sob responsabilidade da Professora Angélica Amorim Amato foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Mus musculus* (80 machos). A presente aprovação é válida pelo período de: 1º/3/2017 a 1º/12/2019.



  
Profa. Dra. Paula Diniz Galera  
Coordenadora da CEUA – UnB



\*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

## ANEXO B - A COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL INDIVIDUAL

