

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

LOUISE TAVARES GARCIA PEREIRA

**A MODULAÇÃO DO MICROBIOMA INTESTINAL MELHORA O
COMPROMETIMENTO DA MEMÓRIA INDUZIDO PELA DIETA
RICA EM GORDURA EM CAMUNDONGOS**

BRASÍLIA

2023

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LOUISE TAVARES GARCIA PEREIRA

**A MODULAÇÃO DO MICROBIOMA INTESTINAL MELHORA O
COMPROMETIMENTO DA MEMÓRIA INDUZIDO PELA DIETA
RICA EM GORDURA EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Doutor em Ciências
Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Angélica Amorim Amato

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Andreza Fabro de Bem

BRASÍLIA

2023

LOUISE TAVARES GARCIA PEREIRA

**A MODULAÇÃO DO MICROBIOMA INTESTINAL MELHORA O
COMPROMETIMENTO DA MEMÓRIA INDUZIDO PELA DIETA
RICA EM GORDURA EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Doutor em Ciências
Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília.

Banca examinadora

Aprovado em ____ de _____ de 2023

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Angélica Amorim Amato (Presidente)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves

Profa. Dra. Angelica Thomaz Vieira

Profa. Dra. Luciene Bruno Vieira

Profa. Dra. Cinthia Gabriel Meireles

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, Laise e minha cunhada Juliana, pela convivência e amparo do dia-a-dia.

Aos meus colegas do Laboratório de Farmacologia Molecular e do Lab. de Bem, Paula, Wembley, Victor, Wellington, Luma, Nadyellem, Ariane, Natália 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, Professora Dra. Angélica Amorim, por ser uma excelente profissional, a qual me espelho.

À minha coorientadora, Professora 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 e do Lab. de Bem, pelo aprendizado e pela experiência profissional proporcionada.

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

“Sonhos determinam o que você quer. Ação determina o que você conquista.”

Aldo Novak

RESUMO

A microbiota intestinal tem sido cada vez mais associada a várias doenças metabólicas e neurodegenerativas. Estudos recentes mostraram que uma dieta rica em gordura, além da disfunção metabólica, induz comprometimento cognitivo e perturba a composição da microbiota intestinal. Nosso estudo investigou o impacto da modulação da microbiota intestinal na função metabólica e cognitiva em camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica. Camundongos machos C57BL/6 com seis semanas de idade foram alimentados com uma dieta controle (CD, n = 9) ou uma dieta hiperlipídica (HFD, n = 26). Na idade de 7 semanas, os camundongos alimentados com HFD foram aleatoriamente designados para receber veículo (grupo controle, n = 8), antibióticos (ATB, n = 9) e antibióticos seguidos de transplante de microbiota fecal (FMT) de doadores alimentados com CD (n = 9). Antibióticos (ciprofloxacino 0,2 g/L e vancomicina 0,5 g/L) foram administrados da 10^a à 15^a semana, na água de beber. O transplante fecal foi realizado na 13^a semana por três dias consecutivos, após a retirada do antibiótico e manutenção dos camundongos receptores com HFD. O peso e a ingestão hídrica foram medidos semanalmente. A função cognitiva foi avaliada na 15^a semana pelo teste de reconhecimento de objetos e a tolerância à glicose foi avaliada na 16^a. A composição da microbiota foi analisada por sequenciamento do gene 16S rRNA. Camundongos alimentados com HFD mostraram parâmetros metabólicos alterados, incluindo excesso de peso e intolerância à glicose, e a modulação da microbiota com ATB ou FMT impediu o ganho excessivo de peso e melhorou a sensibilidade à glicose. A análise da microbiota nas fezes revelou que a ingestão de HFD diminui a diversidade da microbiota, em comparação com camundongos CD, e FMT restaurou a diversidade de filos. HFD induziu a hipertrofia de adipócitos nos tecidos adiposos visceral, subcutâneo e marrom. O tratamento com ATB ou FMT preveniu essa hipertrofia. Além disso, camundongos alimentados com HFD apresentaram memória de reconhecimento prejudicada, completamente revertida pelo FMT e parcialmente revertida pelo tratamento com ATB. Camundongos alimentados com HFD também apresentaram astrogliose na região CA1 do hipocampo, que foi revertida pelo FMT. Não houve diferenças na coloração de GFAP no hipocampo DG entre os grupos. Nossos achados sugerem que a modulação da microbiota intestinal pode ser uma estratégia pertinente para prevenir a disfunção metabólica e cognitiva induzida pelo consumo de HFD.

Palavras-chave: microbiota intestinal, função cognitiva, tecido adiposo, hipocampo.

ABSTRACT

The gut microbiota has been increasingly linked to several metabolic and neurodegenerative diseases. Recent studies have shown that a high-fat diet, beyond metabolic dysfunction, induces cognitive impairment and disrupts gut microbiota composition. Our study investigated the impact of gut microbiota modulation on metabolic and cognitive outcomes in mice fed a high-fat diet. Six-week-old male C57BL/6 mice were fed a control diet (CD, n = 9) or a high-fat diet (HFD, n = 26). At the age of 7 weeks, mice fed a HFD were randomly assigned to receive vehicle (control group, n = 8), antibiotics (ATB, n = 9), and antibiotics followed by fecal microbiota transplantation (FMT) from CD-fed donors (n = 9). Antibiotics (ciprofloxacin 0.2 g/L and vancomycin 0.5 g/L) were administered from the 10th to the 15th week, in drinking water. Fecal transplantation was carried out at the 13th week for three consecutive days, following antibiotic withdrawal and maintenance of recipient mice on HFD. Weight and water intake were measured weekly. Cognitive function was assessed at the 15th week by the object recognition test, and glucose tolerance was assessed at the 16th. Microbiota composition was analyzed by 16S rRNA gene sequencing. HFD-fed mice showed altered metabolic parameters, including overweight and glucose intolerance, and microbiota modulation with either ATB or FMT prevented excessive weight gain and improved glucose sensitivity. Microbiota analysis in feces revealed that HFD intake diminishes microbiota diversity, compared to CD mice, and FMT restored the phyla diversity. HFD induced hypertrophic adipocytes in several fat pads: visceral, subcutaneous and brown. Treatment with ATB or FMT prevented this hypertrophy. Moreover, HFD-fed mice presented impaired recognition memory, completely reversed by FMT and partially reversed by ATB treatment. HFD-fed mice also presented astrogliosis in hippocampal CA1 region, which was reversed by FMT. There were no differences in GFAP staining at hippocampal DG between groups. Our findings suggest that modulating gut microbiota may be a pertinent strategy to prevent metabolic and cognitive dysfunction induced by a HFD consumption.

Keywords: High fat diet, gut microbiota, cognition function, adipose tissue, hippocampus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O desenvolvimento da microbiota intestinal e suas funções.....	18
Figura 2. Mecanismos de interação do eixo microbiota-intestino-cérebro.....	24
Figura 3. Estratégias usadas para investigar o papel do eixo microbiota-intestino-cérebro na saúde e na doença.....	28
Figura 4. Delineamento experimental.....	35
Figura 5. A modulação da microbiota melhora o ganho de peso induzido por HFD e a intolerância à glicose.....	40
Figura 6. Modulação do microbioma intestinal por antibióticos e transplante de microbiota fecal previne a hipertrofia do tecido adiposo induzida por HFD.....	42
Figura 7. Influência da dieta e do transplante de microbiota fecal no microbioma fecal.....	44
Figura 8. A modulação do microbioma intestinal por transplante microbiano fecal de doadores alimentados com dieta controle reverte a disfunção de memória induzida por dieta hiperlipídica.....	46
Figura 9. FMT melhora a astrogliose induzida por HFD na região CA1 do hipocampo.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Antibióticos
BHE	Barreira hematoencefálica
BSA	Soro albumina bovina
CEUA-IB	Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília
CD	Dieta Controle
DC	Células dendríticas
DG	Giro Denteado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EEC	Células enteroendócrinas
ENS	Sistema nervoso entérico
FMT	Transplante de microbiota fecal
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GF	Roedores livre de germes
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon 1
HFD	Dieta Hiperlipídica
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corporal
LPS	Lipopolissacarídeos
OMS	Organização Mundial da Saúde
16S Rna	RNA ribossomal 16s
SCFA	Ácidos graxos de cadeia curta
SNC	Sistema nervoso central
TBS	Solução salina tamponada com Tris
TBST	Solução salina tamponada com Tris e Triton
TGI	Trato gastrointestinal
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TTG	Teste de tolerância à glicose

LISTA DE UNIDADES DE MEDIDA

g	Gramma
L	Litro
g/L	Gramma por litro
kg/m ³	Quilogramma por metro cúbico
mL	Mililitro
μL	Microlitro
μL/L	Microlitro por Litro
nm	Nanomolar

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
SUMÁRIO.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 OBESIDADE	15
2.2 MICROBIOTA INTESTINAL	17
2.3 OBESIDADE, DIETA HIPERLIPÍDICA E DÉFICT COGNITIVO.....	20
2.4 EIXO MICROBIOTA-INTESTINO-CÉREBRO	22
2.5 MICROBIOTA INTESTINAL EM CONDIÇÕES RELACIONADAS AO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	25
2.6 MODELOS USADOS PARA O ESTUDO DA MICROBIOTA INTESTINAL	27
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 OBJETIVO GERAL.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 ESTUDO <i>IN VIVO</i> E PROJETO EXPERIMENTAL.....	33
4.2 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (TTG).....	36
4.3 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL PELO SEQUÊNCIAMENTO DO GENE 16S rRNA.....	36
4.4 HISTOLOGIA.....	37
4.5 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	37
4.5.1 TESTE DO CAMPO ABERTO	37
4.5.2 TESTE DE RECONHECIMENTO AO NOVO OBJETO.....	38
4.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA ÁCIDA FRIBILAR GLIAL	38
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
5. RESULTADOS.....	40
5.1 A MODULAÇÃO DO MICROBIOMA INTESTINAL DIMINUI O GANHO DE PESO INDUZIDO POR DIETA HIPERLIPÍDICA E A INTOLERÂNCIA À GLICOSE.....	40

5.2 A MODULAÇÃO DO MICROBIOMA INTESTINAL DIMINUI A HIPERTROFIA DE ADIPÓCITOS INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA.....	41
5.3 TRANSPLANTE DE MICROBIOMA FECAL DE DOADORES COM DIETA CONTROLE MELHORA A DIMINUIÇÃO DA DIVERSIDADE DA MICROBIOTA FECAL INDUZIDA PELA DIETA HIPERLIPÍDICA	43
5.4 TRANSPLANTE DE MICROBIOMA FECAL DE DOADORES ALIMENTADOS COM DIETA CONTROLE MELHORA O DÉFICIT COGNITIVO INDUZIDO POR DIETA HIPERLIPÍDICA.....	45
5.5 TRANSPLANTE DE MICROBIOMA FECAL DE DOADORES ALIMENTADOS POR DIETA CONTROLE DIMINUI A ASTROGLIOSE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA	47
6. DISCUSSÃO.....	49
7. CONCLUSÃO.....	53
8. REFERÊNCIAS	54
ANEXO A - DECLARAÇÃO DA CEUA.....	65

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), sobrepeso e obesidade são definidos como acúmulo anormal ou excessivo de gordura que apresenta risco à saúde. A microbiota intestinal tem sido reconhecida como um importante fator no desenvolvimento de doenças metabólicas como a obesidade e é considerada um órgão endócrino envolvido na manutenção da homeostase energética do hospedeiro (Gomes, Hoffmann & Mota, 2018).

Os avanços tecnológicos mostraram a enorme diversidade, capacidade funcional e dinâmica associada ao microbioma humano. As 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. Um grande número de diversas espécies microbianas reside no trato gastrointestinal distal e a disbiose intestinal – desequilíbrio na composição e função da microbiota intestinal – está associada a doenças que variam de distúrbios gastroenterológicos localizados a neurológicos, doenças respiratórias, metabólicas, hepáticas e cardiovasculares. Atualmente, muitos estudos estão explorando a potencial causalidade e mecanismos de doenças envolvendo a microbiota intestinal, com a esperança de que a melhor compreensão alimente a concepção e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e preventivas de doenças (Minemura & Shimizu, 2015; Lynch & Pedersen, 2016).

Indivíduos obesos têm um risco aumentado de desenvolver doenças neurodegenerativas. Uma característica comum das doenças metabólicas é a ativação crônica e de baixo grau do sistema inflamatório. Essa inflamação pode eventualmente se espalhar do tecido periférico para o cérebro, e a neuroinflamação é um mecanismo causal importante no declínio cognitivo (Solas et al., 2017). Assim, a inflamação sistêmica e central pode ser um elo entre a obesidade e as doenças neurodegenerativas. E este estado inflamatório, por sua vez, pode ser desencadeado por alterações na composição da microbiota intestinal (Stranahan, 2022).

A microbiota intestinal influencia o metabolismo do hospedeiro, a fisiologia e o desenvolvimento do sistema imunológico. A composição da microbiota intestinal é influenciada por vários fatores como dieta, idade, genética do hospedeiro e estilo de vida. Estratégias para reequilibrar essas flutuações prejudiciais se mostram eficazes no tratamento dessas doenças, como é o caso do uso de probióticos, prebióticos e do transplante de microbiota fecal, que apresentam grande eficiência (Gomaa, 2020).

O eixo microbiota-intestino-cérebro é a comunicação bidirecional entre o intestino e o cérebro, que ocorre através de múltiplas vias que incluem mediadores hormonais, neurais e imunológicos. Os sinais ao longo desse eixo podem se originar no intestino, no cérebro ou em ambos, com o objetivo de manter a fisiologia e imunidade intestinal normal, incluindo a manutenção da homeostase de vários sistemas, apetite e controle de peso, como modulador do comportamento do hospedeiro, onde tem impacto nos processos de neurodesenvolvimento e nas funções cerebrais. A desregulação da atividade do eixo microbiota-intestino-cérebro está associada a doenças metabólicas e transtornos psiquiátricos e não psiquiátricos comórbidos, onde alterações na composição ou função da microbiota intestinal também podem contribuir para a interrupção do diálogo molecular existente no intestino e no cérebro (De Palma et al., 2014; Agustí et al., 2018).

Neste trabalho mostramos que a modulação do microbioma intestinal por transplante de microbiota fecal de camundongos alimentados com dieta controle (CD) para camundongos receptores de dieta rica em gordura, reverte o comprometimento da memória de reconhecimento induzido por dieta rica em gordura.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 OBESIDADE

A obesidade resulta de um balanço energético positivo, que ocorre quando a quantidade de energia ingerida excede a quantidade gasta, e é um forte fator de risco para outras complicações metabólicas, como o diabetes tipo 2, resistência à insulina, inflamação metabólica, hipertensão e certos tipos de câncer, contribuindo para a redução da expectativa de vida, prejuízo da qualidade de vida e incapacidades (Sonnenburg & Bäckhed, 2016; Blüher, 2020).

Ao contrário de ser apenas uma condição médica ou fator de risco para outras doenças, a obesidade é uma doença complexa de etiologia multifacetada, com suas próprias fisiopatologias e comorbidades. Atende à definição médica de doença na medida em que é uma disfunção fisiológica do organismo humano com etiologias ambientais, genéticas e endocrinológicas. É uma resposta a estímulos ambientais, predisposição genética e anormalidades, e apresenta um conjunto característico de sinais e sintomas com alterações anatômicas consistentes. O excesso de tecido adiposo aumenta o trabalho do coração e leva a alterações anatômicas nesse órgão. Altera funções pulmonares, endócrinas e imunológicas, todas com efeitos adversos à saúde. A obesidade merece atenção séria dado ao excesso de mortalidade, morbidade substancial e o custo econômico (Conway & Rene, 2004; De Lorenzo et al., 2019).

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).

Segundo Piché et al. (2020), a obesidade não deve ser avaliada apenas pelo índice de massa corporal (expresso em kg/m^2) por representar uma entidade heterogênea. Estudos de imagem cardiometabólica mostraram que alguns indivíduos com peso normal ou com

excesso de peso correm alto risco se tiverem excesso de tecido adiposo visceral – uma condição geralmente acompanhada de acúmulo de gordura em tecidos normalmente magros (deposição ectópica de gordura no fígado, coração, músculo esquelético, etc.). Quantidades excessivas de tecido adiposo visceral e de gordura ectópica definem em grande parte o risco de doença cardiovascular de sobrepeso e obesidade moderada.

A maioria dos dados epidemiológicos sobre obesidade é baseada no IMC (em kg/m²) e usa os intervalos de 18,5–24,9 para normalidade, 25–29,9 para sobrepeso e ≥ 30 para obesidade. Além disso, a correlação entre IMC e risco de doença não é linear. Mais de 60% da carga global de comorbidades associadas à obesidade afeta indivíduos com IMC ≥ 30 , que representam apenas $\sim 10\%$ da população global de pessoas com sobrepeso/obesidade. Além disso, o IMC é responsável por apenas $\sim 17\%$ do risco de resistência à insulina e subsequente diabetes tipo 2 na população com IMC ≥ 25 . A epigenética e o nível socioeconômico, parece desempenhar um papel muito mais importante do que o IMC na determinação do risco de desenvolvimento de doenças não transmissíveis relacionadas à obesidade, como diabetes (Caballero, 2019).

A inflamação associada à obesidade é inicialmente desencadeada pelo excesso calórico e está localizada principalmente em tecidos metabólicos especializados, como o tecido adiposo branco, que atua como uma importante fonte de energia e é composto principalmente de adipócitos. Os adipócitos são células endócrinas que secretam uma grande variedade de citocinas, hormônios e fatores de crescimento, denominados adipocinas. O tecido adiposo de pessoas com obesidade contém um número aumentado de macrófagos e um aumento de ácidos graxos livres, resultando em alterações na produção de adipocinas, aumento do estresse oxidativo e, por sua vez, a regulação positiva de citocinas inflamatórias, levando a uma resposta inflamatória de baixo grau. Os macrófagos uma vez ativados, secretam uma série de citocinas, como TNF- α , IL-6 e IL-1. A expressão de marcadores de macrófagos no tecido adiposo humano foi elevada em indivíduos com obesidade e resistência à insulina (Singla et al., 2010; Kolb et al., 2016; Fasshauer & Blüher, 2015).

A inflamação induzida pela obesidade pode ser melhor descrita como metainflamação: uma resposta inflamatória crônica de baixo grau iniciada pelo excesso de nutrientes nas células metabólicas. A sinalização inflamatória conduzida pela célula metabólica eventualmente causa a ativação de células imunes especializadas, onde os sinais metabólicos que emergem das células metabólicas iniciam as respostas inflamatórias e danificam a homeostase metabólica. A metainflamação em geral tem efeitos inibitórios sobre a ação da insulina nos tecidos metabólicos. Outra marca da inflamação metabólica encontrada na obesidade é sua cronicidade. O estado inflamatório induzido pela sobrecarga metabólica leva a um estado crônico sem resolução aparente. Apesar de sua natureza de baixo grau, a inflamação do tecido adiposo impacta negativamente a função de órgãos remotos, fenômeno considerado causador das complicações da obesidade (Gregor & Hotamisligil, 2011; Kawai, Autieri & Scalia, 2021).

2.2 MICROBIOTA INTESTINAL

O trato gastrointestinal (TGI) humano abriga trilhões de microrganismos, incluindo cerca de 1.000 espécies bacterianas diferentes. Essas bactérias, conhecidas coletivamente como microbiota intestinal, desempenham várias funções vitais no corpo humano. As funções incluem defender o hospedeiro contra patógenos, alterar a digestão e absorção de nutrientes, produzir nutrientes essenciais como vitaminas (K e B) e modular o sistema imunológico. Após o nascimento, o trato intestinal do bebê é rapidamente colonizado por microrganismos derivados do contato com a mãe e o meio ambiente (Figura 1). A microbiota intestinal desempenha um papel primordial nos processos metabólicos, fisiológicos e imunológicos, e a mudança da composição da microbiota intestinal influencia a saúde humana (Wu et al., 2019).

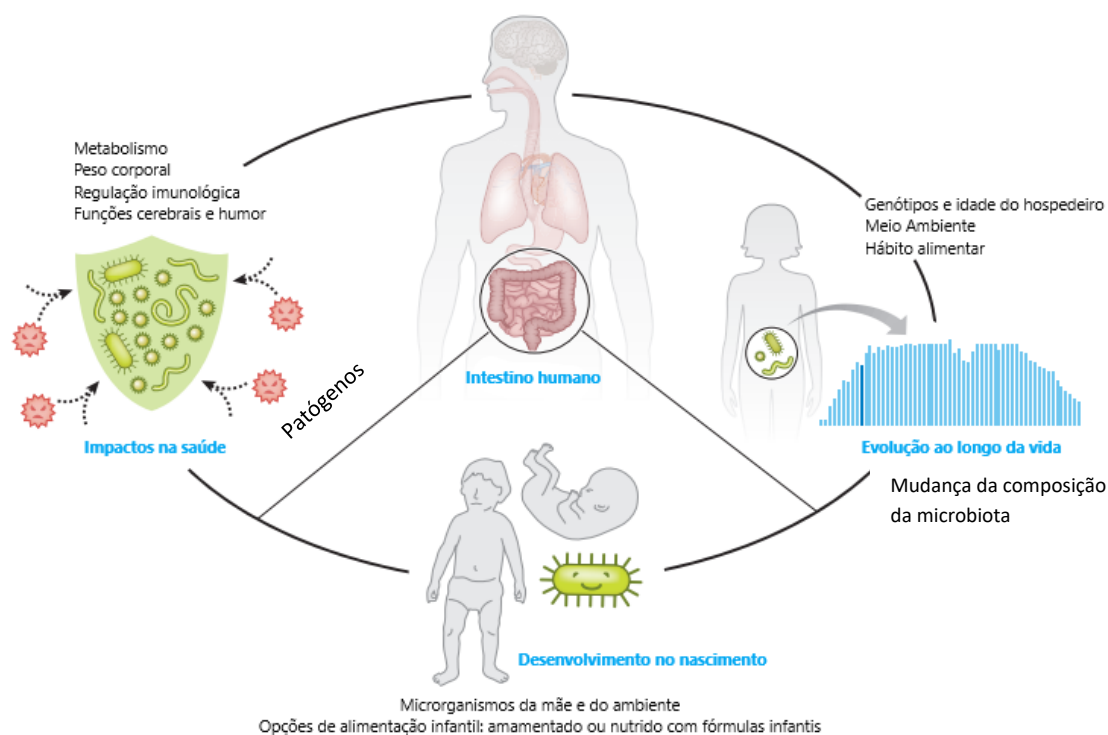


Figura 1. O desenvolvimento da microbiota intestinal e suas funções. Fonte: Adaptada de Wu et al., 2019.

Demonstrado pela análise metagenômica, a composição da microbiota intestinal se transforma ao longo dos estágios iniciais do desenvolvimento humano e é influenciada pela dieta. Por volta dos 3 anos de idade, a composição bacteriana de uma criança se assemelha à de um adulto e permanece estável até a velhice, quando a variabilidade na composição da comunidade aumenta. Em termos de sucessão ecológica, a microbiota da criança dominada por *Bifidobacterium* muda ao longo do tempo para a microbiota dominada por *Bacteroidetes* e *Firmicutes* do adulto. Essa distribuição permanece bastante estável ao longo da vida adulta na ausência de perturbações, como mudanças na dieta a longo prazo ou uso repetido de antibióticos (Cresci & Bawden, 2015; Claesson et al., 2011; Ottman et al., 2012).

Além de estar intimamente envolvida em numerosos aspectos da fisiologia normal do hospedeiro, desde o estado nutricional até o comportamento e a resposta ao estresse, a microbiota também pode ser uma causa central ou contribuinte de muitas doenças, afetando sistemas de órgãos próximos e distantes (Sekirov et al., 2010). Ela também está

fortemente correlacionada com o metabolismo do hospedeiro e o ganho de peso corporal, onde as bactérias intestinais e seus metabólitos afetam o metabolismo e o comportamento alimentar, e a disbiose desse biossistema pode levar à síndrome metabólica. Com isso, a microbiota intestinal se tornou outro possível alvo terapêutico para tratar a obesidade, tendo como potenciais terapias a suplementação da dieta com organismos probióticos e compostos prebióticos que influenciam o crescimento bacteriano e o uso de transplante de microbiota fecal (Lee et al., 2019).

A microbiota associada à obesidade altera a captação de energia do hospedeiro, a resistência à insulina, a inflamação e a deposição de gordura. Além disso, a microbiota intestinal pode regular o metabolismo, a adiposidade, a homeostase e o balanço energético, bem como o apetite central e a sinalização de recompensa alimentar, que juntos têm um papel crucial na obesidade. Algumas cepas de bactérias e seus metabólitos podem atingir o cérebro diretamente via estimulação vagal ou indiretamente através de mecanismos imuno-neuroendócrinos (Torres-Fuente et al., 2017; Asadi et al., 2022).

Diferenças na microbiota intestinal entre pessoas magras e obesas revelam que a microbiota é caracterizada pela presença reduzida de taxa pertencente ao filo Bacteroidetes e um aumento proporcional nos membros do filo Firmicutes em pessoas obesas. Por outro lado, uma diminuição na relação Firmicutes/Bacteroidetes foi diretamente relacionada à perda de peso. A mudança na composição da microbiota pode aumentar a capacidade do hospedeiro de absorver energia dos alimentos digeridos e produzir metabólitos e produtos microbianos, como ácidos graxos de cadeia curta, ácidos biliares secundários e lipopolissacarídeos. Esses metabólitos e produtos microbianos atuam como moléculas sinalizadoras que modulam o apetite, a motilidade intestinal, a captação e armazenamento de energia e o gasto de energia. Além disso, humanos obesos e roedores têm uma composição alterada da microbiota intestinal com menor diversidade filogenética em comparação aos controles magros, e o transplante da microbiota intestinal de indivíduos obesos para camundongos livres de germes pode transferir o fenótipo obeso (Heiss & Olofsson, 2018; Ley et al., 2006; Turnbaugh et al., 2006).

A disbiose causada pela obesidade pode alterar o funcionamento da barreira intestinal permitindo a passagem de componentes estruturais de bactérias, como o LPS, e ativando vias inflamatórias que podem contribuir para o desenvolvimento da resistência à insulina pela alteração da sinalização do receptor de insulina pela presença de citocinas inflamatórias, e o metabolismo lipídico pode ser alterado pelas alterações observadas no microbioma intestinal, resultando em um estímulo para aumentar a adiposidade corporal (Gomes et al., 2018; Virtue et al., 2019).

A microbiota intestinal desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase do intestino, através de interações com o sistema imune do hospedeiro. Ainda é incerto como ocorre a comunicação do eixo intestino-cérebro-microbiota. Acredita-se que esta comunicação aconteça tanto de forma direta como indireta, e que o aumento da permeabilidade intestinal tenha um papel chave neste processo, haja vista que o afrouxamento de células epiteliais do trato gastrointestinal promove a troca de substâncias entre o lúmen e a região abdominal (bactérias e produtos do metabolismo das bactérias) (Lach et al., 2017).

2.3 OBESIDADE, DIETA HIPERLIPÍDICA E DÉFICT COGNITIVO

A gordura dietética tem sido apontada como responsável pelo aumento da adiposidade. Estudos em camundongos e humanos mostraram que dietas ricas em gordura podem facilmente induzir a obesidade, aumentando peso corporal e massa de tecido adiposo, bem como resistência à insulina (French & Robinson, 2003; Buckley et al., 2021).

Dietas ricas em gordura reduzem os ciclos de alimentação/jejum em camundongos, aumentando a proporção de energia consumida durante a fase de descanso e o ganho de massa gorda. O acesso *ad libitum* a HFD de forma consistente e rápida produz obesidade em muitos animais, e os ritmos endócrinos são igualmente atenuados em humanos obesos (Potter, 2016). Os mecanismos fisiológicos envolvidos na obesidade induzida por dietas hiperlipídicas são o consumo excessivo de HFD devido ao seu baixo efeito saciante, a alta eficiência de armazenamento da gordura dietética no organismo, alterações da

concentração plasmática de fatores metabólicos desfavoráveis, de forma dose-dependente, como glicose, colesterol, triglicerídeos, ácidos graxos livres, leptina e diminuição da supressão da secreção de grelina (Hariri & Thibault, 2010; Ghibaudi et al., 2002).

A dieta pode modificar o microbioma intestinal, que por sua vez tem um impacto profundo na saúde geral. Este impacto pode ser benéfico ou prejudicial, dependendo da identidade relativa e abundância das populações bacterianas constituintes. Foi demonstrado que uma dieta rica em gordura reduz a abundância relativa de bactérias como *Akkermansia Muciniphila* e *Lactobacillus*, ambas associadas a estados metabólicos saudáveis. Essa observação fornece um bom exemplo de como a intervenção dietética pode ser usada para gerenciar doenças complexas, como obesidade e diabetes (Singh et al., 2017).

A ingestão de HFD, adicionalmente, é associada a modificação da composição da microbiota intestinal caracterizada por aumento da abundância relativa de Gram-positivos (Firmicutes) e diminuição da abundância relativa de Gram-negativos (Bacteroidetes). Dessa forma, a razão Firmicutes:Bacteroidetes é maior em indivíduos muito obesos em comparação com indivíduos “obesos saudáveis” e magros. A redução do peso corporal como consequência de uma dieta com restrição energética demonstrou reduzir a relação Firmicutes:Bacteroidetes para valores semelhantes aos de indivíduos magros (Hersoug, Møller & Loft, 2018; Furet et al., 2010; Ley et al., 2006).

A relação entre obesidade e comprometimento cognitivo é importante devido ao avanço da obesidade na população global, na qual o declínio cognitivo e os distúrbios neurodegenerativos acarretarão graves encargos individuais, sociais e financeiros. A obesidade e suas comorbidades estão associadas ao desempenho cognitivo prejudicado, declínio cognitivo acelerado e patologias neurodegenerativas, como a demência (Dye et al., 2017; Ramírez et al., 2022).

A obesidade e alimentação rica em gordura, levam à inflamação sistêmica e excesso de ácidos graxos livres circulantes. Citocinas circulantes, ácidos graxos livres e células

imunes atingem o cérebro no nível do hipotálamo e iniciam a inflamação local, incluindo a proliferação microglial, que por sua vez também libera citocinas pró-inflamatórias. Essa inflamação local causa remodelação sináptica e neurodegeneração no hipotálamo, alterando o circuito hipotalâmico interno e as saídas hipotalâmicas para outras regiões do cérebro. O resultado é a interrupção da função cognitiva mediada por regiões como hipocampo, amígdala e centros de processamento de recompensas. A inflamação central também pode afetar diretamente essas regiões e ser um fator importante para sinalização apoptótica e morte neuronal. Assim, a inflamação central na obesidade leva não apenas à interrupção dos sinais hipotalâmicos de saciedade e à perpetuação de excessos, mas também a resultados negativos na cognição (Miller & Spencer, 2014; Gómez-Apo et al., 2021).

2.4 EIXO MICROBIOTA-INTESTINO-CÉREBRO

Recentemente, tornou-se evidente que as bactérias intestinais podem afetar a fisiologia e a inflamação do sistema nervoso central (SNC). O sistema nervoso e o trato gastrointestinal se comunicam por meio de uma rede bidirecional de vias de sinalização chamada eixo intestino-cérebro, que consiste em múltiplas conexões, incluindo o nervo vago, o sistema imunológico, metabólitos e produtos bacterianos (Figura 2). Durante a disbiose, essas vias são desreguladas e associadas à permeabilidade alterada da barreira hematoencefálica (BHE) e à neuroinflamação. No entanto, numerosos mecanismos por trás do impacto da microbiota intestinal no neurodesenvolvimento e na patogênese permanecem pouco compreendidos. Existem várias vias imunes envolvidas na homeostase e inflamação do SNC. Entre esses, a via do inflamassoma tem sido associada a condições neuroinflamatórias, como esclerose múltipla, doenças de Alzheimer e Parkinson, mas também ansiedade e transtornos do tipo depressivo. O complexo inflamassoma se monta na ativação celular devido à exposição a microrganismos, sinais de perigo ou estresse e leva à produção de citocinas pró-inflamatórias (Rutsch, Kantsjö, & Ronchi, 2020; Pellegrini et al., 2020).

Existem várias vias diretas e indiretas (via circulação sistêmica) através das quais a microbiota intestinal pode modular o eixo intestino-cérebro. Elas incluem vias endócrinas

(cortisol), imunes (citocinas) e neurais (vago, sistema nervoso entérico (ENS) e nervos espinhais). Vários microrganismos intestinais são capazes de sintetizar neurotransmissores (ácido γ -aminobutírico (GABA), noradrenalina e dopamina) localmente, que podem atuar nas células-alvo no intestino e atuar como uma importante via de comunicação. Metabólitos microbianos neuroativos podem modular o cérebro e o comportamento através de várias maneiras que ainda estão sendo elucidadas. Isso inclui afetar as células epiteliais para afetar a função da barreira intestinal e as células enteroendócrinas (EECs) para liberar hormônios no TGI, bem como células dendríticas (DCs) para modular a função imunológica. Estruturas especializadas em EECs, conhecidas como neurópodes, demonstraram transduzir sinais sensoriais do meio intestinal para o cérebro através da formação de conexões semelhantes a sinapses para nervos aferentes, incluindo o nervo vago. O ENS pode se comunicar com o cérebro por meio de vias vagais e espinhais. No entanto, as vias de sinalização molecular exatas de todas essas vias envolvidas ainda precisam ser definidas (Margolis, Cryan & Mayer, 2021; Kanai & Teratani, 2022; Forsythe, Bienenstock & Kunze, 2014).

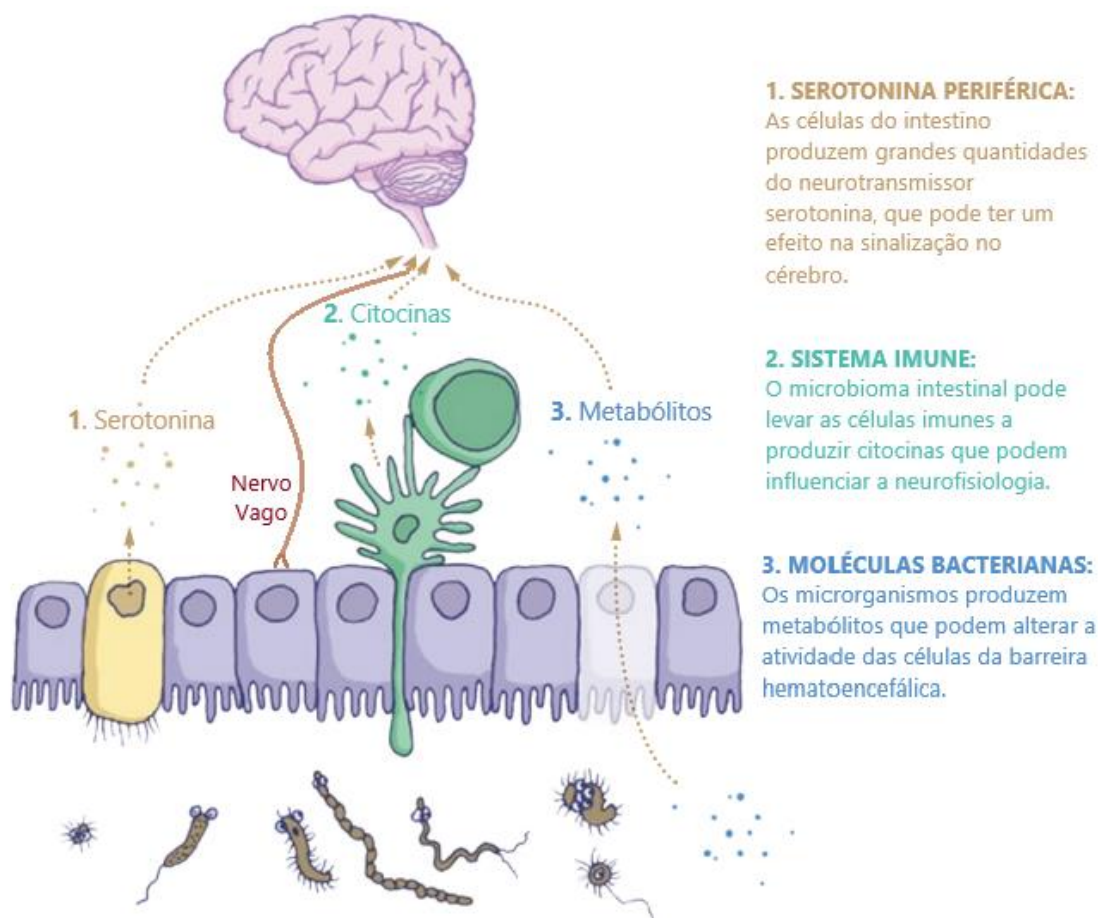


Figura 2. Mecanismos de interação do eixo microbiota-intestino-cérebro. Fonte: Adaptada de Smith, 2015.

A comunicação bidirecional ao longo do eixo intestino-cérebro é um aspecto fundamental da sinergia entre a microbiota e o hospedeiro no acesso às vias de sinalização do intestino-cérebro para modular o cérebro e o comportamento do hospedeiro. Os estudos realizados para identificar e examinar o eixo microbiota-intestino-cérebro usam intervenções de microbiota diferentes, mas complementares, incluindo roedores livre de germes (GF), depleção induzida por antibióticos, suplementação de prebiótico/probiótico, infecção do TGI e transplante de microbiota fecal (FMT) (Cryan et al., 2019).

A microbiota intestinal é um alvo modificável e, portanto, pode ser usada para tratar e melhorar os sintomas de distúrbios psiquiátricos. O eixo microbiota-intestino-cérebro pode ser modificado com certos prebióticos (modificação dietética/dietas ricas em fibras não digeríveis), probióticos (bactérias vivas), antibióticos, simbióticos (combinações de

pré e probióticos), pós-bióticos (produtos de fermentação bacteriana, como ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs)) e FMT. Todas essas abordagens podem ser consideradas psicobióticas em potencial, pois são sugeridas para melhorar a saúde mental por meio de suas propriedades modificadoras da microbiota (Mörkl et al., 2020; Lee, Yacyshyn & Yacyshyn, 2019).

2.5 MICROBIOTA INTESTINAL EM CONDIÇÕES RELACIONADAS AO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

As associações estabelecidas entre obesidade e transtornos mentais (comprometimento cognitivo, alterações de humor e comportamento social) em estudos epidemiológicos e experimentais apontam para fatores contribuintes compartilhados e mecanismos fisiopatológicos. Essas associações podem estar relacionadas a alterações induzidas pela dieta na microbiota intestinal que, por sua vez, podem contribuir para a (neuro) inflamação e desregulação do sistema neuroendócrino associado à obesidade com comprometimentos mentais. Essa hipótese foi confirmada até certo ponto em modelos experimentais, que investigaram a eficácia de alguns probióticos ou compostos que alteram a microbiota intestinal, tanto atenuando a obesidade quanto os transtornos mentais associados (Agustí et al., 2018; Jiang et al., 2017).

A capacidade da microbiota intestinal de se comunicar com o cérebro e, assim, modular o comportamento está emergindo como um conceito interessante em saúde e doença. A microbiota entérica interage com o hospedeiro para formar relacionamentos essenciais que governam a homeostase. Apesar da impressão digital bacteriana entérica única de cada indivíduo, parece haver um certo equilíbrio que confere benefícios à saúde. Portanto, é razoável notar que uma diminuição nas bactérias gastrointestinais desejáveis levará à deterioração das relações gastrointestinais, neuroendócrinas ou imunológicas e, finalmente, à doença. Estudos recentes demonstram que camundongos livres de germes exibem alterações na capacidade de resposta ao estresse, neuroquímica central e comportamento indicativos de uma redução na ansiedade em comparação com camundongos convencionais, onde a modulação específica da microbiota entérica pode

ser uma estratégia útil para distúrbios relacionados ao estresse e outras doenças (Cryan & O'mahony, 2011; Molina-Torres et al., 2019).

Embora o mecanismo preciso ainda não tenha sido totalmente compreendido, o eixo da microbiota intestinal-cérebro se refere a uma rede de comunicação bidirecional entre intestino e cérebro. Sua composição inclui a microbiota intestinal e seus produtos metabólicos, sistema nervoso entérico, ramos simpático e parassimpático dentro do sistema nervoso autônomo, sistema imune neural, sistema neuroendócrino e sistema nervoso central. Além disso, pode haver cinco rotas de comunicação entre a microbiota intestinal e o cérebro, incluindo a rede neural do cérebro, o eixo neuroendócrino-hipotalâmico-pituitário-adrenal, sistema imunológico do intestino, e alguns neurotransmissores e reguladores neurais sintetizados por bactérias intestinais e barreiras, incluindo a mucosa intestinal e barreira hematoencefálica. Nessa rede de comunicação, o cérebro afeta o movimento intestinal, a função sensorial e de secreção, e o peristaltismo também afeta a função cerebral (Wang & Wang, 2016; Lerner, Neidhöfer & Matthias, 2017).

As evidências pré-clínicas apoiam o papel do microbioma intestinal nas respostas comportamentais associadas à dor, emoção, interações sociais e ingestão de alimentos. Evidências clínicas limitadas, mas crescentes, associam a composição e função microbiana intestinal a características comportamentais e função cerebral. Os estados disbióticos observados na depressão, estresse crônico e autismo podem refletir a sinalização cerebral alterada para o intestino, enquanto a sinalização microbiana intestinal alterada para o cérebro podem agravar as alterações cerebrais. Embora estudos realizados em pacientes com depressão e modelos de roedores gerados por transferência microbiana fecal de tais pacientes sugiram causalidade, faltam evidências de uma influência de alterações microbianas intestinais agudas nos parâmetros clínicos e comportamentais humanos. Somente recentemente a terapia de transferência microbiana de rótulo aberto em crianças com autismo validou provisoriamente a microbiota intestinal como alvo terapêutico. O potencial de tradução dos achados pré-clínicos permanece incerto, sem investigação clínica adicional (Martin & Mayer, 2017).

Estudos preliminares em populações psiquiátricas sustentam a visão de uma disbiose em algumas condições, mas os estudos geralmente são em pequena escala e marcados por possíveis variáveis de confusão. Estudos pré-clínicos apoiam a visão de que psicobióticos ('bactérias que quando ingeridas em quantidades adequadas têm um benefício positivo para a saúde mental') podem ser úteis no tratamento de alguns pacientes com dificuldades de saúde mental (Kelly et al., 2017; Takada et al, 2016; Romijn, 2015). Foi demonstrado que um coquetel de probióticos altera a atividade cerebral, conforme monitorado por ressonância magnética funcional, onde observou-se que a *Bifidobacterium longum* altera a atividade elétrica cerebral. Porém, ainda não foi demonstrado de forma convincente que os achados de eficácia psicobiótica demonstrados em modelos pré-clínicos de doenças psiquiátricas se traduzirão em pacientes, sendo necessários mais estudos (Dinan & Cryan, 2017).

Segundo Luczynski et al., 2016, a microbiota é necessária para a responsividade normal ao estresse, comportamentos semelhantes à ansiedade, sociabilidade e cognição. Além disso, a microbiota mantém a homeostase do sistema nervoso central regulando a função imunológica e a integridade da barreira hematoencefálica. A microbiota intestinal também influencia os neurotransmissores, sinalização sináptica e neurotrófica e a neurogênese. Com isso, aumentar a compreensão do impacto da microbiota intestinal no cérebro e no comportamento tem o potencial de informar novas estratégias de manejo para distúrbios gastrointestinais e neuropsiquiátricos relacionados ao estresse.

2.6 MODELOS PARA ESTUDO DA MICROBIOTA INTESTINAL

As abordagens que têm sido usadas para elucidar o papel da microbiota intestinal no comportamento e na cognição incluem o uso de animais livre de germes, animais com infecções bacterianas patogênicas e animais expostos a agentes probióticos ou antibióticos (Figura 3). A maioria desses estudos destaca um papel da microbiota na modulação da resposta ao estresse e na modulação de comportamentos relacionados ao estresse que são relevantes para transtornos psiquiátricos, como ansiedade e depressão (Cryan & Dinan, 2012).

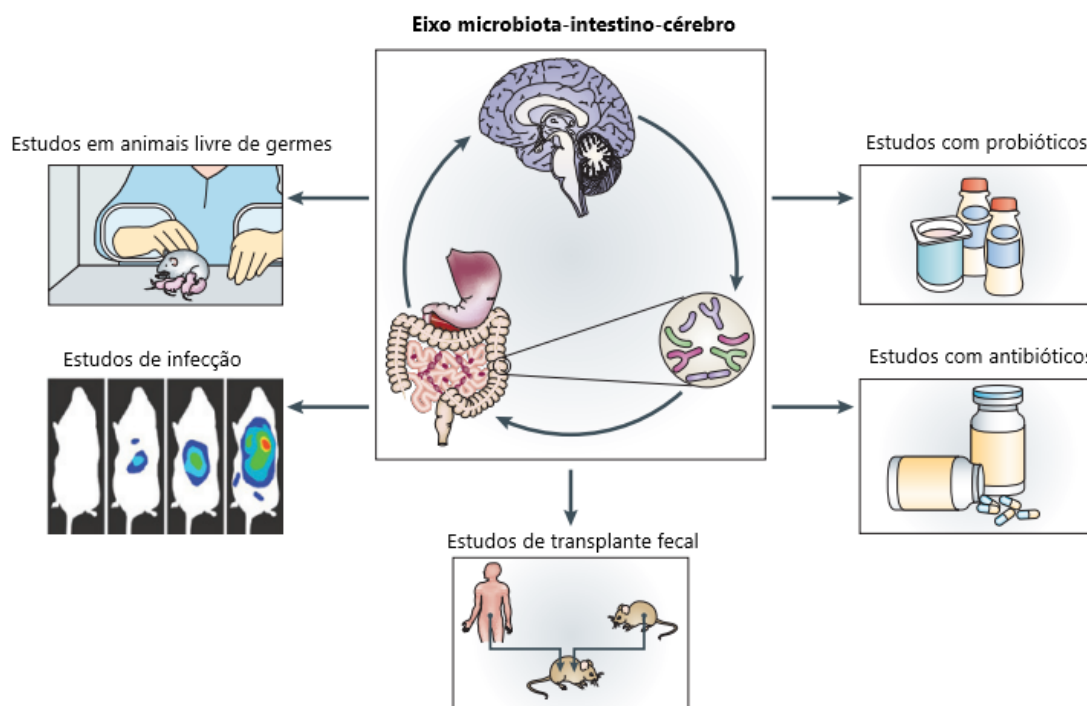


Figura 3. Estratégias usadas para investigar o papel do eixo microbiota-intestino-cérebro na saúde e na doença. Fonte: Adaptada de Cryan & Dinan, 2012.

As novas descobertas de que os probióticos podem ter um impacto nos comportamentos cognitivos normais são particularmente interessantes, pois sugerem que existe uma certa flexibilidade no eixo intestino-cérebro-microbiota, bem na idade adulta e após a conclusão dos estágios de desenvolvimento considerados o momento crítico para mediar possíveis mudanças. Mudar a composição da microbiota, em parte 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).

O gênero *Lactobacillus* inclui várias bactérias gram-positivas. Eles podem converter açúcares hexose em ácido lático, produzindo assim um ambiente ácido que impede o crescimento de várias espécies de bactérias nocivas. Em humanos, os *Lactobacillus* estão particularmente presentes no trato gastrointestinal e na vagina e, juntamente com as *Bifidobactérias*, que são as primeiras bactérias que são colonizadas no intestino na idade pós-natal. Os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são frequentemente usados como

probióticos. Os probióticos parecem ter inúmeras funções, incluindo anti-inflamatórias, antidiabéticas, antiobesidade, antipatogenicidade, angiogênicas, atividades anticancerígenas e propriedades neuroprotetoras. (Salami, 2021; Makarova et al., 2006; Walter, 2008; Walker, 2013; Kusku-Kiraz et al., 2018; George Kerry et al., 2018).

Alguns estudos mostraram o potencial efeito dos probióticos na modulação do eixo microbiota-intestino-cérebro. Uma combinação de probióticos contendo *Lactobacillus* (*Lactobacillus rhamnosus* R0011+*L. helveticus* R0052) previne déficits induzidos por estresse na memória de reconhecimento após infecção com o patógeno bacteriano entérico *Citrobacter rodentium*. Os probióticos podem restaurar a ativação neuronal na região CA1 do hipocampo, que foi diminuída após a exposição ao estresse agudo em camundongos infectados pelo patógeno. Este estudo sugeriu que os probióticos podem influenciar a expressão dos principais mediadores do comportamento cognitivo dentro das estruturas do sistema límbico (Gareau, 2016; Gareau et al., 2011). A administração de *Bifidobacterium* (*B. longum*) melhora a função cognitiva em camundongos saudáveis (Savignac, Kiely, Dinan, & Cryan, 2014). A alimentação de camundongos com dieta de estilo ocidental pode induzir ganho de peso e déficits cognitivos, que podem ser melhorados pela administração de *L. helveticus* R0052 (Ohland et al., 2013).

Os animais GF são uma ferramenta de pesquisa que forneceu a base para grande parte do trabalho que foi feito para elucidar o mecanismo por trás da existência dessa comunidade microbiana complexa. Os modelos GF são vantajosos porque oferecem um sistema experimental simplificado no qual doenças ou membros específicos da microbiota intestinal podem ser estudados isoladamente. Modelos GF também têm sido usados para estudar os efeitos dos probióticos no hospedeiro. No entanto, o uso de animais GF tem algumas desvantagens. Como a microbiota intestinal é crucial para o desenvolvimento adequado do hospedeiro, as respostas alteradas exibidas pelos animais GF podem não refletir o que realmente ocorre no ambiente natural (Sekirov et al., 2010).

Prebióticos podem promover o crescimento de bactérias benéficas sobre espécies comensais desfavoráveis no intestino. Os prebióticos foram redefinidos como compostos não digeríveis que, através do seu metabolismo por microrganismos intestinais, modulam

a composição, atividade, ou ambas, da microbiota intestinal, o que confere um efeito fisiológico benéfico ao hospedeiro. Embora os carboidratos da dieta, como oligossacarídeos, fruto-oligossacarídeos e galacto-oligossacarídeos, sejam os prebióticos mais comumente usados, outros compostos, como polifenóis, também podem se encaixar nessa definição. A administração de dietas ricas em fibras aumenta a abundância de bactérias benéficas no intestino, como algumas *Bifidobacterium* e *Lactobacillus spp*, causando efeitos anti-obesidade (Torres-Fuentes et al., 2017; Bindels et al., 2015; Torres-Fuentes et al., 2015).

O tratamento com antibióticos pode ser usado para depletar a microbiota, fazendo com que a neurogênese hipocampal seja reduzida em camundongos adultos normais, efeito que é reversível pelo exercício ou administração de um coquetel probiótico (Mohle et al., 2016). A depleção por antibióticos em ratos adultos tem um impacto limitado no estresse e ansiedade, mas aumenta os comportamentos do tipo depressivo, reduz as respostas à dor visceral e prejudica a cognição (Hoban et al., 2016). Por outro lado, quando administrados durante o desenvolvimento pós-natal, os antibióticos promovem hipersensibilidade visceral em ratos machos adultos sem afetar as respostas de ansiedade, cognitivas, imunes ou relacionadas ao estresse (O'Mahony et al., 2014). A depleção da microbiota por antibióticos em camundongos adolescentes após o desmame levou à redução da ansiedade, juntamente com déficits cognitivos medidos na idade adulta, mostrando que o efeito da depleção depende do estágio de vida para avaliar o impacto sobre o funcionamento fisiológico (Foster, Rinaman & Cryan, 2017; Desbonnet et al., 2015).

Uma nova estratégia promissora para alterar a composição da microbiota intestinal é a FMT de doadores saudáveis no trato intestinal do paciente, normalmente por colonoscopia ou endoscopia duodenal, resultando na restauração da estrutura e funcionalidade da comunidade microbiana intestinal normal. As cepas microbianas doadoras em seres humanos podem colonizar a microbiota intestinal receptora e persistir por pelo menos 3 meses após o FMT. No entanto, as compatibilidades doador-receptor são importantes para o estabelecimento bem-sucedido das cepas microbianas do doador

no intestino do receptor, com maior chance de prosperar se a espécie já estiver presente no receptor (Torres-Fuentes et al., 2017; Khoruts & Sadowsky, 2016; Li, Zhu & Benes, 2016).

A microbiota intestinal ajuda a equilibrar as principais funções vitais do hospedeiro, incluindo a imunidade e estado nutricional. As alterações na composição e/ou atividade da microbiota intestinal podem estar implicadas no controle da inflamação, armazenamento de gordura e resposta alterada da glicose em pacientes obesos. Os Probióticos e prebióticos são ferramentas de pesquisa interessantes para avaliar a relevância de bactérias específicas na obesidade. Um desafio futuro é avaliar e confirmar a relevância de nutrientes e/ou tratamentos capazes de promover seletivamente bactérias benéficas (probióticos, prebióticos e outros) para controlar a adiposidade e distúrbios metabólicos relacionados (Delzenne & Cani, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel da microbiota intestinal sobre a disfunção cognitiva e alterações metabólicas induzidas pela dieta hiperlipídica em camundongos C57BL/6.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar o efeito da modulação da microbiota intestinal por antibióticos e transplante de microbiota fecal em camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta normo ou hiperlipídica, sobre as seguintes variáveis na vida adulta:

- Ganho de peso.
- Teste de tolerância à glicose.
- Função cognitiva, por meio de testes comportamentais (campo aberto e reconhecimento de objeto).
- Massa e características histológicas de depósitos de tecido adiposo branco subcutâneo (inguinal e abdominal anterior), tecido adiposo branco visceral (epididimal/parametrial e retroperitoneal) e marrom interescapular.
- Atividade microglial determinada pela expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) no encéfalo, por análise imuno-histoquímica.
- Análise da composição da microbiota intestinal pela sequência do gene 16S rRNA em DNA extraído de amostras fecais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ESTUDO *IN VIVO* E PROJETO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos de experimentação animal e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biologia da UnB, com número de protocolo nº 23106.110055/2021-87 - Anexo A. Os animais foram provenientes da Universidade Católica de Brasília. Foram utilizados camundongos C57Bl/6, machos, com 6 semanas de idade. Após sua chegada ao biotério da UnB, os animais passaram por um período de adaptação ao novo ambiente antes de sua utilização.

Os animais foram divididos em dois grupos de dieta, alimentados com dieta controle (normolipídica - CD) ou dieta hiperlipídica (HFD), fornecida na forma de *pellet* partir da 7ª semana até a 16ª semana de vida. 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 obtidas da empresa PRAGSOLUÇÕES Biociências®. A composição da CD e da HFD estão apresentadas na Tabela 1. O fornecimento de dieta e de água potável (filtrada) foi *ad libitum* e os animais separados em grupos de até 5 animais por gaiola e mantidos em microisoladores, com temperatura controlada (23-25°C) e ciclo claro/escuro de 12 horas cada.

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®

A partir da 7ª semana de vida, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais:

Grupo 1: animais que receberam somente dieta controle (CD, n=9).

Grupo 2: animais que receberam somente a dieta hiperlipídica (HFD, n=8).

Grupo 3: animais que receberam a dieta hiperlipídica e o tratamento com antibióticos (HFD+ATB, n=9).

Grupo 4: animais que receberam dieta hiperlipídica e o tratamento com antibióticos e na 13ª semana de idade foi realizado o transplante fecal, após a suspensão da administração de antibióticos (HFD+FMT, n=9).

O tratamento com antibióticos, para a modulação da microbiota intestinal, foi realizado com ciprofloxacino 0,2 g/L e vancomicina 0,5 g/L, da 10ª à 16ª semana (6 semanas), na água potável para a modulação da microbiota intestinal. O esquema de administração foi baseado em dados do estudo prévio de Suez et al (2014). Ambos foram diluídos na água filtrada e para a completa diluição da ciprofloxacino fez-se necessário

acrescentar 280 $\mu\text{L/L}$ de ácido acético glacial. Os animais que não pertencem aos grupos tratados com antibióticos receberam apenas água filtrada.

Na 13ª semana realizou-se o transplante de fezes, após a retirada de antibióticos e a manutenção de camundongos alimentados com a HFD. O material fecal coletado de animais alimentados com CD e veículo, passou pelo processo de homogeneização com solução salina estéril, centrifugação a 800 rpm por 2 min e o sobrenadante coletado e dado por gavagem, 300 μL por animal, conforme esquema utilizado previamente por Suez et al. (2014). Os outros animais receberam apenas solução salina estéril. O tratamento teve duração de 3 dias seguidos. Os testes comportamentais ocorreram na 14ª semana.

O peso corporal foi avaliado semanalmente. Na 15ª semana, avaliou-se a glicemia, medida no sangue capilar com auxílio de glicosímetro. Os camundongos foram eutanasiados na 16ª semana. Após a eutanásia, foram coletados amostra de tecidos para análises histológicas dos diferentes depósitos de tecido adiposo e encéfalo para análise imuno-histoquímica (Figura 4).

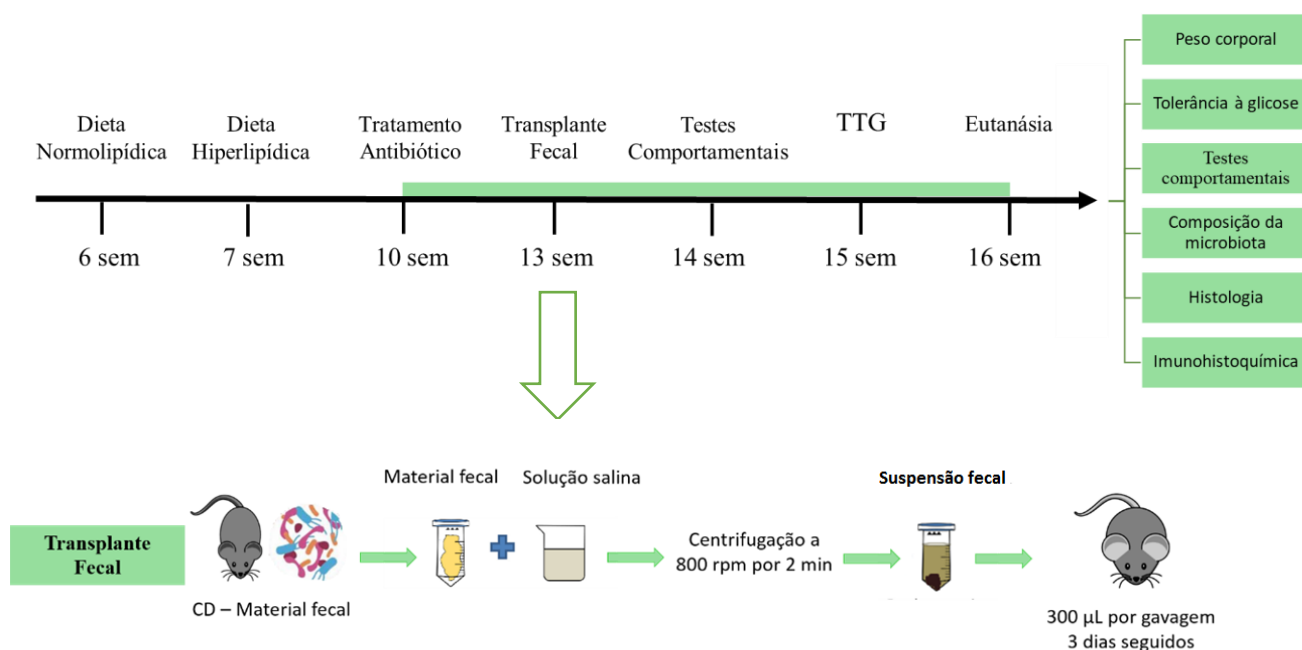


Figura 4. Delineamento experimental. Camundongos machos C57BL/6 foram tratados com dieta normo ou hiperlipídica, da 7ª à 16ª semana de vida. Da 10ª semana à 16ª semana de vida, o grupo HFD+ATB recebeu tratamento com antibióticos na água de beber, para promover a modulação da microbiota intestinal

e o grupo HFD+FMT recebeu tratamento com antibiótico até a 13^a semana, quando foi realizado o transplante de fezes. Fonte: Autoria própria.

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

4.2 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (TTG)

Após 6 horas de jejum diurno, sem restrição de acesso à água, foram coletadas 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).

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

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.

Os dados de sequenciamento microbiano 16S foram analisados usando o software Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME) (<http://www.qiime.org>).

4.4 HISTOLOGIA

As amostras de tecido adiposo branco e marrom foram fixadas com formaldeído 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 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). O tamanho dos adipócitos foi determinado usando o software ImageJ (versão 1.8. U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA).

4.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.5.1 TESTE DO CAMPO ABERTO

O teste do campo aberto é utilizado para investigar a atividade locomotora dos animais (Prut e Belzung, 2003). A arena é feita de madeira com assoalho branco, dividido por linhas pretas em 25 quadrados (10 x 10 cm) e cercado por paredes elevadas com 45,5 cm de altura e 60 cm de diâmetro. Os animais foram colocados no centro do campo aberto, individualmente, e o número total de cruzamentos foi registrado por 5 minutos. Um cruzamento é quando o animal atravessa o quadrado com as quatro patas. O teste foi filmado e analisado pelo programa ANY-maze Behavior Tracking Software, e foram avaliados os seguintes parâmetros: distância total percorrida (m), tempo de permanência no centro da arena (s), número de cruzamentos, velocidade máxima (m/s) e velocidade média (m/s).

4.5.2 TESTE DE RECONHECIMENTO AO NOVO OBJETO

Neste teste, o animal foi familiarizado com um objeto, e então, após um período, é apresentado simultaneamente ao mesmo objeto e a um novo objeto. Os objetos utilizados apresentam nível exploratório, complexidade física e tamanho similares.

Na sessão treino, dois objetos idênticos foram apresentados aos camundongos. Neste momento, é registrado o tempo de exploração de cada um dos objetos colocados na arena do campo aberto, 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 agora contém um objeto novo e um objeto previamente explorado. Neste período registra-se, novamente, o tempo de exploração de cada um dos objetos durante 5 minutos (Figura 5). Os seguintes comportamentos serão considerados como exploração do objeto: cheirar, tocar ou observar o objeto a menos de 1 cm de distância. Um índice de discriminação - $[t(s) A2 \times 100 / \{t(s) A2 + t(s) A1\}]$, onde A2 é o tempo gasto pelos animais explorando o objeto novo e A1 é o tempo gasto pelos animais explorando o objeto velho - é utilizado para medir a memória de reconhecimento (Greco et al., 2010). O teste foi filmado e analisado pelo programa ANY-maze Behavior Tracking Software.

4.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA ÁCIDA FIBRILAR GLIAL

A proliferação astrocítica foi avaliada pela marcação da proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Os cérebros dissecados foram fixados em paraformaldeído a 4%, embebidos em parafina e cortados em seções de 5 µm de espessura. As seções foram então incubadas com tampão citrato por 30 min a 95°C para recuperação do antígeno, lavadas com solução salina tamponada com Tris (TBS) e incubadas com solução de bloqueio (4% BSA em TBS + 0,5% Triton, TBST) por 2 h. A imunocoloração foi realizada com incubação com anticorpo primário anti-GFAP de camundongo (1:200; Sigma, San Louis, Missouri, EUA), preparado na solução bloqueadora. As seções foram então lavadas com TBST e incubadas com anticorpo anti-camundongo biotilado secundário. A ligação do anticorpo foi detectada usando HRP/DAB Polyvalent Detection Kit (Abcam, Cambridge,

UK), seguido por coloração de hematoxilina. A marcação foi observada com o Aperio Digital Pathology Slide Scanner CS2 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha) sob ampliação de 20X. Imagens de CA1 e giro denteado do hipocampo foram obtidas para quantificação de GFAP imunopositivos, medindo-se a área total marcada usando o software ImageJ (versão 1.8. U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos relativos ao peso 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 7.0 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 A MODULAÇÃO DO MICROBIOMA INTESTINAL DIMINUI O GANHO DE PESO INDUZIDO POR DIETA HIPERLIPÍDICA E A INTOLERÂNCIA À GLICOSE

A modulação da microbiota intestinal por antibióticos ou FMT diminuiu o ganho de peso induzido por HFD e, no final da semana 16, o ganho de peso em ambos os grupos foi comparável ao de camundongos alimentados com CD (Figuras 5A e 5B).

A ingestão de HFD prejudicou a homeostase da glicose em camundongos, conforme indicado pelo aumento dos níveis da glicemia em jejum (Figura 5C) e diminuição da tolerância à glicose (Figuras 5D e 5E), em comparação com a ingestão de CD. Tanto o tratamento antibiótico quanto o FMT melhoraram a intolerância à glicose induzida por HFD (Figuras 5D e 5E), com o efeito dos antibióticos sendo de maior magnitude, conforme indicado pelos níveis de glicemia em jejum e sobrecarga de glicose após injeção intraperitoneal, comparáveis aos de camundongos alimentados com CD (Figuras 5D e 5E).

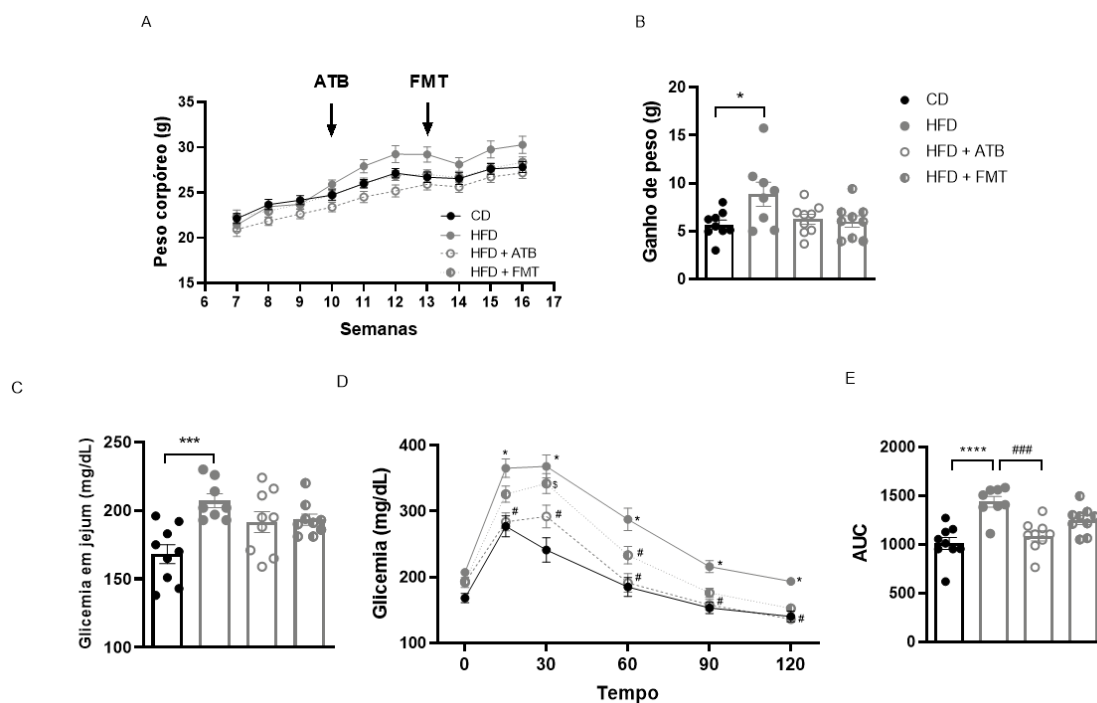


Figura 5. A modulação da microbiota melhora o ganho de peso induzido por HFD e a intolerância à glicose. (A) Peso corporal antes e depois do tratamento com antibiótico e FMT, (B) ganho de peso no final do experimento, (C) níveis de glicemia em jejum na semana 15, (D) níveis de glicemia antes e 15, 30, 60, 90 e 120 min após a administração intraperitoneal de 1 g/kg de glicose, e (E) a área sob a curva (AUC) do teste de tolerância à glicose (GTT). Dados apresentados como média $\pm$ SEM. As diferenças ao longo do tempo no peso corporal e nos níveis de glicose no GTT entre os grupos de tratamento foram analisadas por ANOVA de duas vias, e ANOVA de uma via foi usada para examinar as diferenças no ganho de peso, glicemia em jejum e AUC no GTT entre os grupos; n = 8-9 para cada grupo experimental. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$.

5.2 A MODULAÇÃO DO MICROBIOMA INTESTINAL DIMINUI A HIPERTROFIA DE ADIPÓCITOS INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA

A alimentação por HFD induziu hipertrofia de adipócitos no tecido adiposo branco visceral (WAT Visceral, Figuras 6A e 6B), WAT subcutâneo (Figuras 6C e 6D) e tecido adiposo marrom (BAT, Figuras 4E e 6F). A modulação do microbioma intestinal por antibióticos e FMT em camundongos alimentados com HFD diminuiu a hipertrofia dos adipócitos em todos os depósitos adiposos avaliados, conforme indicado pela área reduzida dos adipócitos, e o efeito dos antibióticos e FMT foram comparáveis ao dos animais alimentados com a CD (Figuras 6A-F).

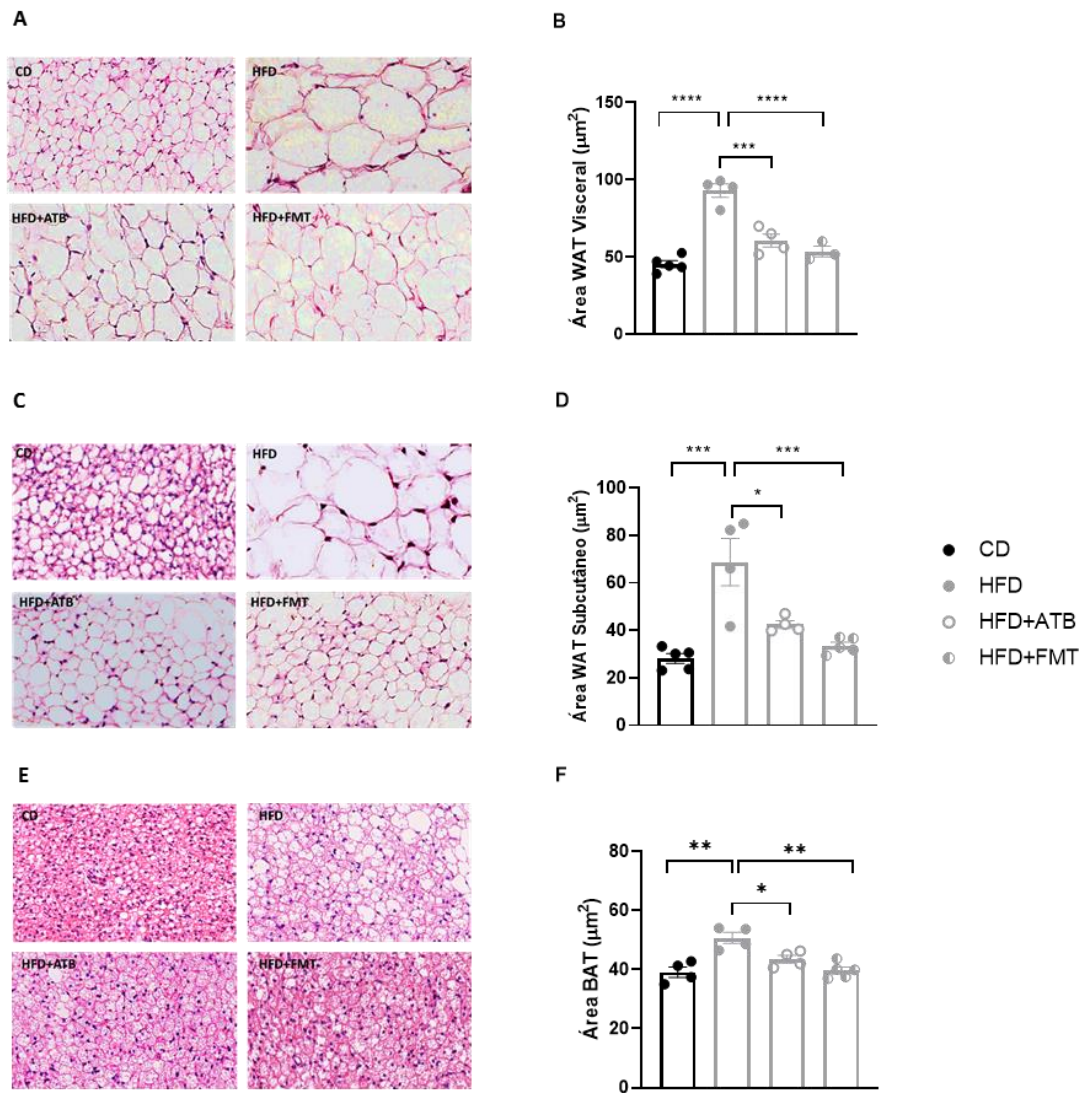


Figura 6. Modulação do microbioma intestinal por antibióticos e transplante de microbiota fecal previne a hipertrofia do tecido adiposo induzida por HFD. Tecido adiposo branco visceral (A e B), subcutâneo (C e D) e tecido adiposo marrom (E e F) de camundongos alimentados com dieta controle (CD) ou dieta hiperlipídica (HFD), sendo esta última submetida a antibioticoterapia (HFD+ATB) ou transplante de microbioma fecal (HFD+FMT). A, C, E: cortes de tecido adiposo corados com hematoxilina e eosina (aumento de 10X; barra de escala 200 μm; imagem representativa de um depósito adiposo de camundongo de cada grupo experimental). B, D e F: quantificação do tamanho dos adipócitos apresentada como média ± SEM e analisada pela ANOVA one-way). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$.

5.3 TRANSPLANTE DE MICROBIOMA FECAL DE DOADORES COM DIETA CONTROLE MELHORA A DIMINUIÇÃO DA DIVERSIDADE DA MICROBIOTA FECAL INDUZIDA PELA DIETA HIPERLIPÍDICA

A composição da microbiota fecal foi avaliada por sequenciamento 16S rRNA, e os camundongos que receberam HFD e antibióticos foram excluídos devido à depleção completa da microbiota intestinal fecal na semana 16 (dados não mostrados). Camundongos alimentados com CD exibiram uma maior variedade de filos quando comparados com camundongos alimentados com HFD. Camundongos alimentados com HFD recebendo FMT de doadores alimentados com CD mostraram restauração parcial da diversidade de filos (Figura 7A). Notavelmente, a abundância relativa do filo Verrucomicrobia em camundongos alimentados com HFD após o FMT aumentou para níveis semelhantes aos encontrados em camundongos alimentados com CD.

A diversidade alfa do microbioma intestinal fecal na semana 16 foi maior em camundongos alimentados com CD em comparação com camundongos alimentados com HFD e foi aumentada por FMT de doadores alimentados com CD para camundongos alimentados com HFD (Figura 7B). O índice de Shannon, que considera o número de espécies e sua abundância relativa, indicou riqueza e diversidade de espécies significativamente maiores em camundongos alimentados com CD em comparação com camundongos alimentados com HFD, mas não houve efeito significativo de FMT em camundongos alimentados com HFD. Por outro lado, o Índice de Simpson, que se baseia apenas na abundância relativa de espécies, mostrou uma diferença significativa entre os grupos de camundongos alimentados com CD e HFD, representando que a frequência observada no grupo CD é menor do que no grupo HFD (Figura 7B).

A avaliação da diversidade beta do microbioma fecal indicou diferenças significativas entre camundongos alimentados com CD e HFD (Figura 7C). Camundongos alimentados com HFD recebendo FMT de doadores alimentados com CD exibiram uma diminuição na separação de seu microbioma fecal e de camundongos alimentados com CD (Figura 7C).

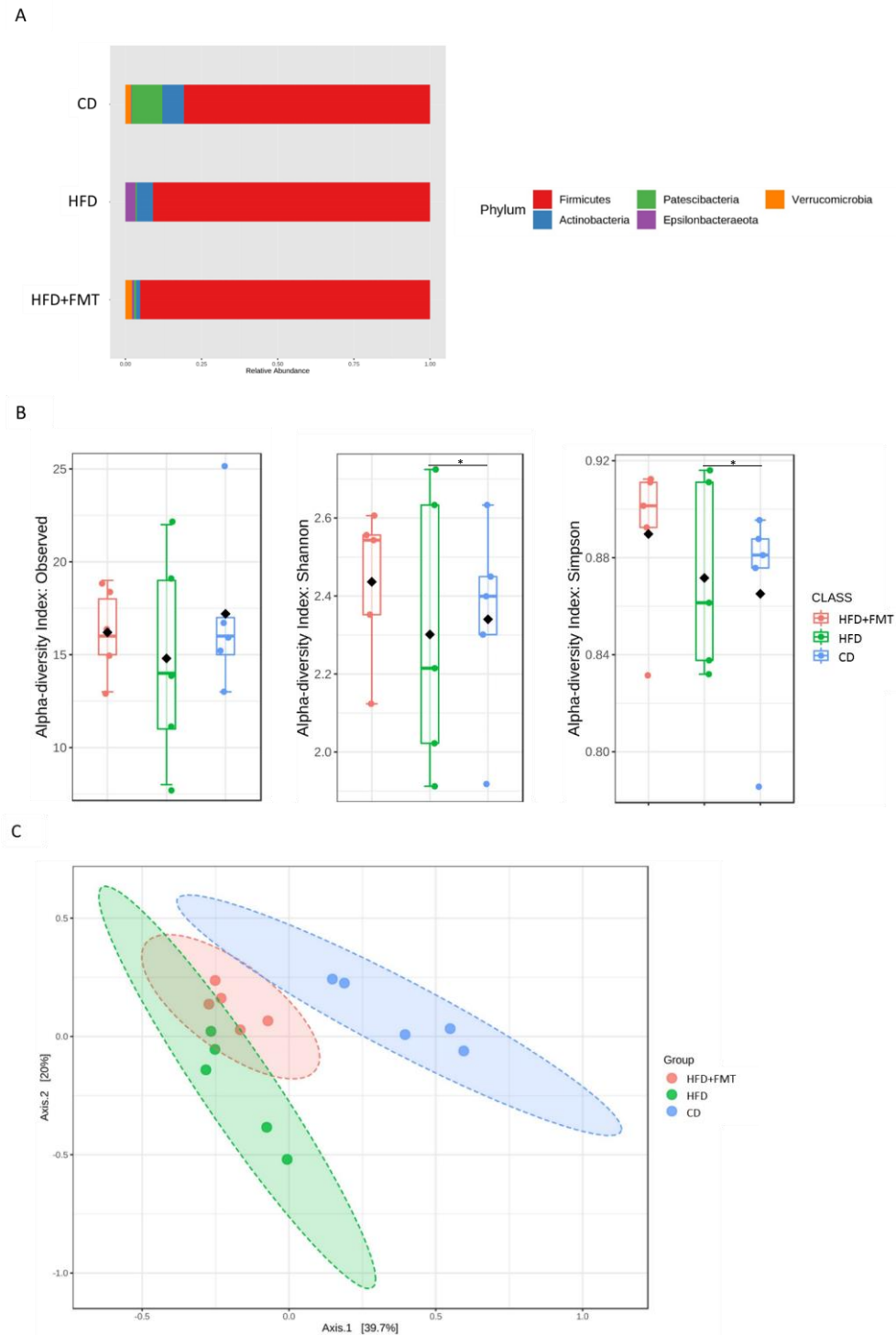


Figura 7. Influência da dieta e do transplante de microbiota fecal no microbioma fecal. Composição do microbioma fecal determinada pelo sequenciamento do gene 16S rRNA no DNA extraído de amostras fecais de camundongos alimentados com uma dieta controle (CD) ou dieta rica em gordura (HFD) e

camundongos alimentados com uma HFD e recebendo transplante microbiano fecal de doadores alimentados com CD (HFD+FMT). (A) Abundância relativa de filos, (B) Boxplots mostrando diversidade alfa usando diferentes métricas (espécies observadas, índice de Shannon e índice de Simpson) e (C) Análise de componentes principais de grupos taxonômicos em filos de diversidade beta. n = 5 em cada grupo experimental; * p<0,05 ANOVA de uma via.

5.4 TRANSPLANTE DE MICROBIOMA FECAL DE DOADORES ALIMENTADOS COM DIETA CONTROLE MELHORA A DEFICIÊNCIA COGNITIVA INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA

Durante o período de habituação na arena de campo aberto, não houve diferença entre os grupos experimentais na atividade exploratória de linha de base, conforme indicado pela distância total percorrida (Figura 8A), tempo gasto na zona central (Figura 8B) e número de cruzamentos (Figura 8C). Camundongos alimentados com CD exibiram memória de reconhecimento típica, conforme demonstrado pelo aumento do comportamento exploratório em relação ao novo objeto usado nas sessões de teste (Figura 8D). Por outro lado, camundongos alimentados com HFD não atingiram a porcentagem exploratória do novo objeto, acima do valor hipotético de 50%, 1h após a seção de treinamento (Figura 8D). Camundongos alimentados com HFD tratados com antibióticos tiveram um aumento não significativo na memória de reconhecimento em comparação com camundongos alimentados com HFD, enquanto camundongos alimentados com HFD que receberam FMT de doadores alimentados com CD recuperaram totalmente a perda de memória de reconhecimento induzida por HFD (Figura 8D).

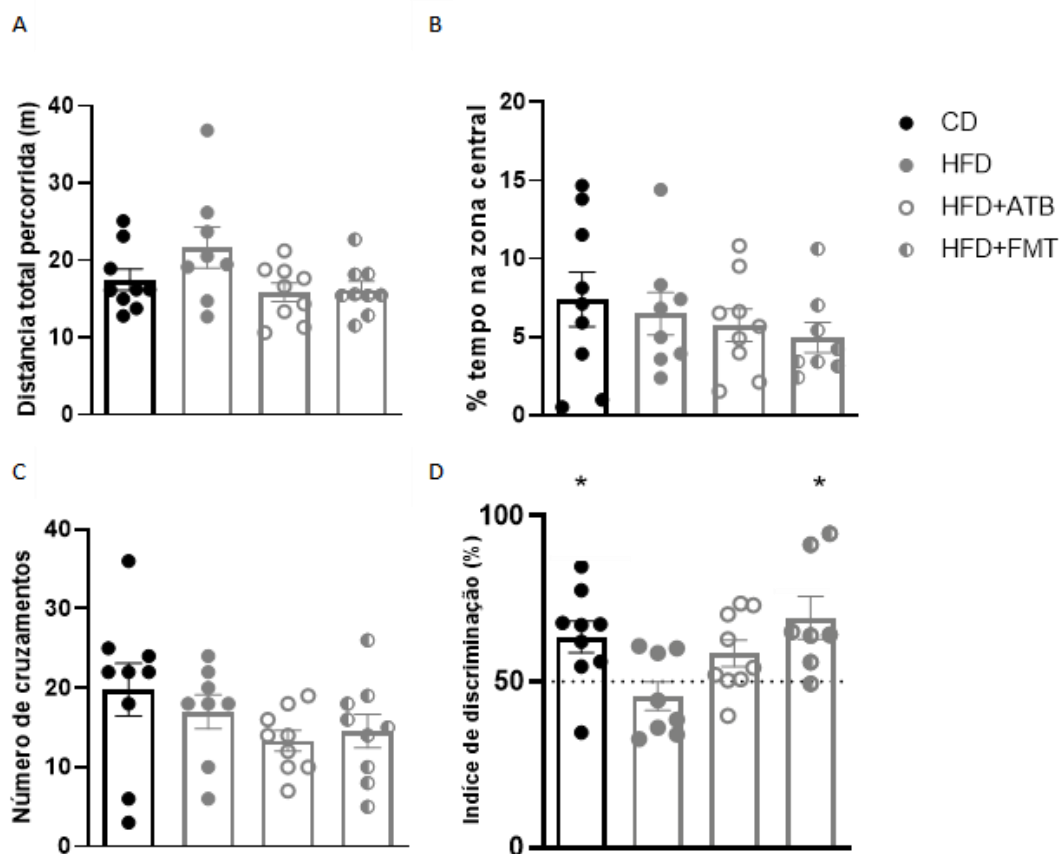


Figura 8. A modulação do microbioma intestinal por transplante microbiano fecal de doadores alimentados com dieta controle reverte a disfunção de memória induzida por dieta hiperlipídica. (A) Distância total percorrida, (B) porcentagem de tempo na zona central e (C) número de cruzamentos na arena durante a habituação em campo aberto antes do teste de reconhecimento ao novo objeto. (D) Desempenho cognitivo no teste de reconhecimento ao novo objeto avaliado pelo índice de discriminação, usando um intervalo de uma hora entre as sessões de treino e teste. Dados apresentados como média $\pm$ SEM. Valores de p versus níveis de chance de 50%, por ANOVA unidirecional.

5.5 TRANSPLANTE DE MICROBIOMA FECAL DE DOADORES ALIMENTADOS POR DIETA CONTROLE DIMINUI A ASTROGLIOSE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA

As células do hipocampo das regiões CA1 e DG foram marcadas para a proteína ácida fibrilar glial, GFAP (Figura 9). A alimentação com HFD induziu astrogliose na região CA1 do hipocampo, conforme indicado pelo aumento na área total corada de GFAP, sugerindo aumento da inflamação local, em comparação com camundongos CD (Figuras 9A e 9B). FMT de doadores alimentados com CD para receptores alimentados com HFD restaurou a expressão de GFAP em CA1 para níveis comparáveis aos de camundongos alimentados com CD, enquanto o tratamento antibiótico de camundongos alimentados com HFD não alterou a expressão de GFAP em comparação com camundongos alimentados com HFD tratados com veículo (Figuras 9A e 9B). No giro denteado (DG), a expressão de GFAP não foi modificada pela alimentação com HFD, quando comparada com a alimentação com CD, mas foi reduzida pela administração de antibióticos a camundongos alimentados com HFD em comparação com camundongos alimentados com HFD tratados com veículo (Figuras 9A e 9C).

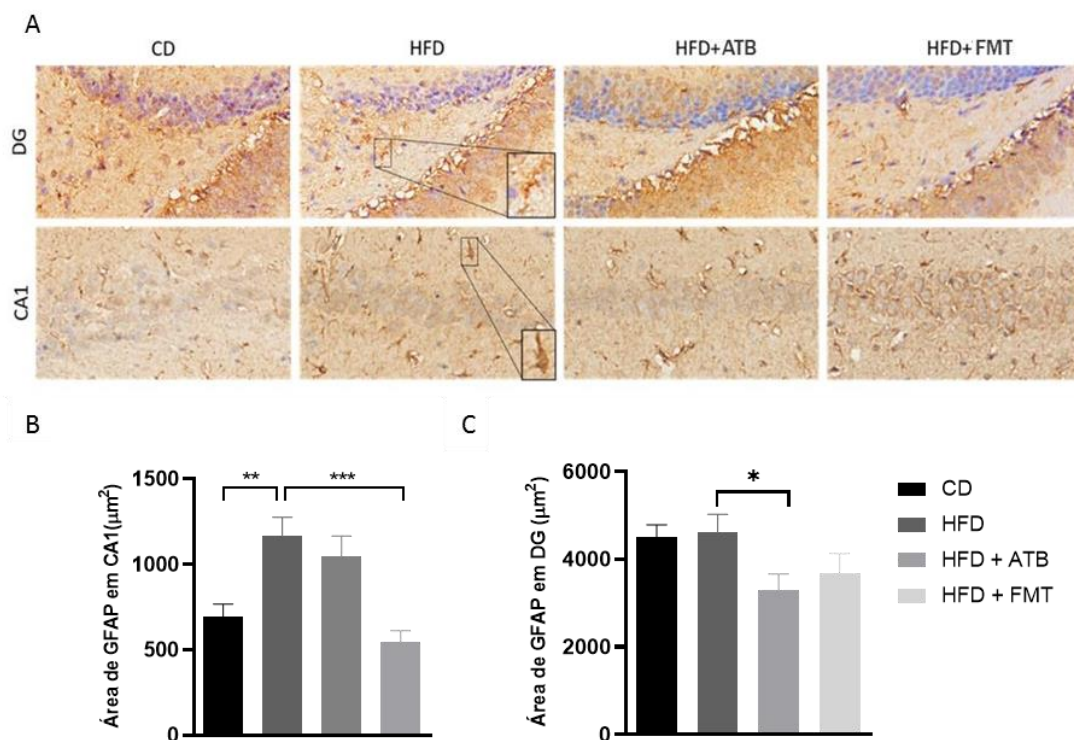


Figura 9. FMT melhora a astroglíose induzida por HFD na região CA1 do hipocampo. (A) Imagens representativas da coloração GFAP no giro dentado, DG (painel superior) e região CA1 (painel inferior) do hipocampo. Quantificação da área corada de GFAP (μm^2) em (B) a região hipocampal CA1 e em (C) as regiões DG apresentadas como média $\pm$ SEM e analisadas por ANOVA de uma via. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, mostramos que a modulação da microbiota intestinal com antibióticos ou FMT melhora a disfunção metabólica e cognitiva induzida pela ingestão excessiva de lipídios saturados na dieta. A própria HFD induziu obesidade, intolerância à glicose, distrofia do tecido adiposo, comprometimento cognitivo e aumento da inflamação no hipocampo observada através da astrogliose. O tratamento com antibióticos em animais alimentados com HFD aliviou o ganho de peso excessivo e restaurou a homeostase da glicose, além de prevenir a hipertrofia do tecido adiposo. O FMT de doadores alimentados com CD para camundongos receptores alimentados com HFD também diminuiu o ganho excessivo de peso corporal, a hipertrofia do tecido adiposo e melhorou a intolerância à glicose. O FMT também melhorou o comprometimento cognitivo induzido por HFD e a astrogliose do hipocampo. Os últimos efeitos foram acompanhados por uma mudança no perfil do microbioma intestinal fecal: enquanto o HFD promoveu um perfil “obesogênico”, o FMT restaurou parcialmente a diversidade perdida com a ingestão excessiva de lipídios.

A HFD leva à obesidade e à alteração da composição do microbioma intestinal, a chamada disbiose intestinal. Este último está associado à inflamação intestinal, diminuição das junções estreitas intestinais e aumento da permeabilidade intestinal, facilitando assim a translocação de moléculas derivadas da microbiota, como o LPS. O LPS circulante está associado à esteatose hepática, alteração da sinalização da insulina e ativação da resposta inflamatória mediada pelo WAT. Essas alterações contribuem para a resistência à insulina (Saad, Santos & Prada, 2016; Aron-Wisnewsky et al., 2021). O acúmulo de evidências mostrou que a dieta pode modificar o microbioma intestinal e essa observação fornece um bom exemplo de como a intervenção dietética pode potencialmente ser usada para controlar doenças complexas, como obesidade e diabetes. O transplante de microbiota fecal tem sido usado com sucesso para gerenciar várias condições diferentes, incluindo obesidade (Singh et al., 2017).

Observamos que o tratamento com antibióticos e o FMT melhoraram a obesidade e a tolerância à glicose em camundongos alimentados com HFD. Esses achados estão

acordo com estudos anteriores relatando que os antibióticos modulam a microbiota intestinal e melhoram a intolerância à glicose induzida por HFD e o ganho de peso, além de estimular a gordura bege e diminuir a massa de gordura branca e o tamanho dos adipócitos. Os últimos efeitos são acompanhados por diminuição do LPS circulante, e essa redução demonstrou diminuir ou mesmo eliminar a ação dos lipídios da dieta que induzem distúrbios metabólicos. (Shi et al., 2006; Cani et al., 2008; Tsukumo et al., 2007; Suárez-Zamorano et al., 2015).

As principais características da microbiota intestinal na obesidade são a redução da diversidade microbiana, com diminuição da abundância relativa de bactérias com potenciais propriedades anti-inflamatórias, e aumento daquelas associadas a distúrbios metabólicos, como diabetes tipo 2 e distúrbios neurológicos. (Festi et al., 2014; Schippa & Conte, 2014; Landman & Quévrain, 2015; Henao-Mejia et al., 2012). Estas características foram confirmadas no presente estudo. O FMT de camundongos alimentados com CD para receptores alimentados com HFD mudou a composição da microbiota intestinal, aumentando a abundância relativa do filo Verrucomicrobia, sugerindo modulação da microbiota para um perfil mais semelhante aos doadores alimentados com CD. A obesidade está associada à menor abundância relativa da espécie *Akkermansia muciniphila*, que pertence ao filo Verrucomicrobia, quando comparada ao estado nutricional eutrófico em camundongos e humanos. Anhê & Marette, (2017) mostraram que o uso de *Akkermansia muciniphila* como probiótico aumentou a capacidade dessa bactéria em reduzir a massa gorda e melhorar a síndrome metabólica em camundongos com obesidade induzida por dieta. Assim, esta espécie apresenta propriedades benéficas contra a obesidade e resistência à insulina, estando associada a um estado metabólico mais saudável. Portanto, é possível que o aumento na abundância relativa do filo Verrucomicrobia após o FMT possa estar diretamente relacionado à melhora metabólica aqui observada.

A obesidade e a resistência à insulina induzida pelo consumo prolongado de HFD acarreta na inflamação intestinal e sistêmica, alterações microgiais, disfunção mitocondrial cerebral e várias anormalidades do hipocampo, como estresse oxidativo e

apoptose. Essas alterações, por sua vez, estão mecanicamente ligadas ao declínio cognitivo associado à obesidade. Chunchai et al. (2018) relataram que prebióticos, probióticos ou simbióticos induzem efeitos neuroprotetores, possivelmente mediados pela atenuação da inflamação, estresse oxidativo hipocampal e apoptose, disfunção mitocondrial e disfunção microglial. Da mesma forma, nossas descobertas apontaram que a modulação da microbiota intestinal por FMT melhorou a disfunção cognitiva induzida por HFD, conforme evidenciado por uma taxa de discriminação superior a 50% no teste de reconhecimento ao novo objeto. Portanto, modular a microbiota intestinal na obesidade pode ser uma estratégia para reverter o comprometimento cognitivo causado pela HFD.

Esses achados estão de acordo com as evidências que indicam que uma microbiota intestinal saudável é necessária para o aprendizado, a memória e a plasticidade sináptica normais dependentes do hipocampo. Os mecanismos subjacentes a tais efeitos incluem a produção e modulação de neurotrofinas, neurotransmissores e receptores, regulação de processos moleculares intracelulares, recuperação do equilíbrio inflamatório/anti-inflamatório e oxidativo/antioxidante e invariabilidade histológica do hipocampo. A atividade dos circuitos neuronais do hipocampo, bem como as funções comportamentais dessa região cerebral, responde positivamente a diferentes misturas de bactérias probióticas (Salami & Soheili, 2022; Tang et al., 2021; Guzzetta, Cryan & O’Leary, 2022). Avaliamos a neuroinflamação pela análise de astrócitos positivos para GFAP na área CA1 e giro dentado (DG) do hipocampo e descobrimos que a HFD induziu astrogliose significativa na área CA1, mas não na área DG. A modulação da microbiota por FMT e antibióticos afetou diferencialmente a astrogliose hipocampal induzida por HFD. FMT de doadores alimentados com CD restaurou a astrogliose em camundongos alimentados com HFD, na área CA1, enquanto o tratamento com antibióticos melhorou a astrogliose induzida por HFD no DG. Os últimos efeitos podem estar mecanicamente ligados à melhora da função cognitiva pela modulação da microbiota intestinal.

Nossos dados suportam a associação entre a microbiota intestinal, homeostase metabólica e cognição, indicando que a modulação da composição da microbiota por

FMT ou tratamento com antibióticos afeta favoravelmente a disfunção metabólica e cognitiva induzida por HFD em camundongos. Esses achados indicam que a modulação da microbiota intestinal pode ser uma estratégia eficaz para lidar com as complicações da obesidade.

7 CONCLUSÃO

Tendo em vista os aspectos observados, mostramos que a modulação do microbioma intestinal por transplante de microbiota fecal de camundongos alimentados com dieta controle (CD) para camundongos receptores de dieta rica em gordura reverte o comprometimento da memória de reconhecimento induzido por HFD. O último efeito é acompanhado por astrogliose diminuída na região CA1 do hipocampo e melhora metabólica. A modulação do microbioma intestinal de camundongos alimentados com HFD por antibióticos promove efeitos semelhantes, embora de menor magnitude. Nossas descobertas destacam o papel da microbiota intestinal no comprometimento cognitivo induzido por HFD e implicam que direcionar a disbiose intestinal tem potenciais benefícios terapêuticos.

8 REFERÊNCIAS

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. *Front Neurosci.* 2018;12:155. Published 2018 Mar 16. doi:10.3389/fnins.2018.00155

AINGE, J. A. et al. The role of the hippocampus in object recognition in rats: examination of the influence of task parameters and lesion size. *Behavioural brain research*, v. 167, n. 1, p. 183-195, 2006.

ALFORD, S., Patel, D., Perakakis, N., & Mantzoros, C. S. (2018). Obesity as a risk factor for Alzheimer's disease: weighing the evidence. *Obesity reviews*, 19(2), 269-280.

ANHÊ, Fernando Forato; MARETTE, André. A microbial protein that alleviates metabolic syndrome. *Nature medicine*, 2017, 23.1: 11-12.

ARON-WISNEWSKY, J., Warmbrunn, M. V., Nieuwdorp, M., & Clément, K. (2021). Metabolism and metabolic disorders and the microbiome: the intestinal microbiota associated with obesity, lipid metabolism, and metabolic health—pathophysiology and therapeutic strategies. *Gastroenterology*, 160(2), 573-599.

ARSLAN N. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. *World J Gastroenterol.* 2014;20(44):16452-63

ASADI, Arezoo et al. Obesity and gut–microbiota–brain axis: A narrative review. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v. 36, n. 5, p. e24420, 2022.

BELAYEV L., BUSTO R., ZHAO W., GINSBERG W.D. Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res.* 1996; 739(1-2):88-96.

BINDELS, Laure B., et al. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 2015, 12.5: 303-310.

BLÜHER, Matthias. Metabolically healthy obesity. *Endocrine reviews*, v. 41, n. 3, p. bnaa004, 2020.

BROCARD, 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* 54, 464–473, 2008. 2013.

BRUN, Paola et al. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 292, n. 2, p. G518-G525, 2007.

BUCKLEY, Tiffany N. et al. High-fat feeding disrupts daily eating behavior rhythms in obesity-prone but not in obesity-resistant male inbred mouse strains. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 320, n. 5, p. R619-R629, 2021.

CABALLERO, Benjamin. Humans against obesity: who will win?. *Advances in nutrition*, 2019, 10.suppl_1: S4-S9.

CANI, Patrice D. et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*, v. 58, n. 8, p. 1091-1103, 2009.

CANI, Patrice D. et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, v. 57, n. 6, p. 1470-1481, 2008.

CANI, Patrice D. et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, v. 56, n. 7, p. 1761-1772, 2007.

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

CHRISTOFF, Ana Paula, et al. Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. *Neoprosecta Microbiome Technologies*, 2017, 25.

CHUNCHAI, T., Thunapong, W., Yasom, S., Wanchai, K., Eaimworawuthikul, S., Metzler, G., ... & Chattipakorn, S. C. (2018). Decreased microglial activation through gut-brain axis by prebiotics, probiotics, or synbiotics effectively restored cognitive function in obese-insulin resistant rats. *Journal of neuroinflammation*, 15(1), 1-15.

CLAESSON, Marcus J., et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108.Supplement 1: 4586-4591.

CONWAY, B.; RENE, A. Obesity as a disease: no lightweight matter. *Obesity Reviews*, 2004, 5.3: 145-151.

- CRESCI, Gail A.; BAWDEN, Emmy. Gut microbiome: what we do and don't know. *Nutrition in Clinical Practice*, 2015, 30.6: 734-746.
- CRYAN, John F., et al. The microbiota-gut-brain axis. *Physiological reviews*, 2019.
- CRYAN, John F.; DINAN, Timothy G. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature reviews neuroscience*, 2012, 13.10: 701-712.
- CRYAN, John F.; O'MAHONY, S. M. The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. *Neurogastroenterology & Motility*, v. 23, n. 3, p. 187-192, 2011.
- D O'BRIEN, P., Hinder, L. M., Callaghan, B. C., & Feldman, E. L. (2017). Neurological consequences of obesity. *The Lancet Neurology*, 16(6), 465-477.
- DE LORENZO, Antonino et al. Why primary obesity is a disease?. *Journal of translational medicine*, v. 17, p. 1-13, 2019.
- DE PALMA, Giada, et al. The microbiota–gut–brain axis in gastrointestinal disorders: stressed bugs, stressed brain or both?. *The Journal of physiology*, 2014, 592.14: 2989-2997.
- DELZENNE, Nathalie M.; CANI, Patrice D. Interaction between obesity and the gut microbiota: relevance in nutrition. *Annual review of nutrition*, 2011, 31: 15-31.
- DESBONNET, Lieve, et al. Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour. *Brain, behavior, and immunity*, 2015, 48: 165-173.
- DHALIWAL, K. K., Orsso, C. E., Richard, C., Haqq, A. M., & Zwaigenbaum, L. (2019). Risk factors for unhealthy weight gain and obesity among children with autism spectrum disorder. *International journal of molecular sciences*, 20(13), 3285.
- DINAN, Timothy G.; CRYAN, John F. Brain-gut-microbiota axis and mental health. *Psychosomatic medicine*, v. 79, n. 8, p. 920-926, 2017.
- DYE, L., Boyle, N. B., Champ, C., & Lawton, C. (2017). The relationship between obesity and cognitive health and decline. *Proceedings of the nutrition society*, 76(4), 443-454.
- DYE, Louise, et al. The relationship between obesity and cognitive health and decline. *Proceedings of the nutrition society*, 2017, 76.4: 443-454.
- FASSHAUER, Mathias; BLÜHER, Matthias. Adipokines in health and disease. *Trends in pharmacological sciences*, 2015, 36.7: 461-470.
- FESTI, Davide, et al. "Gut microbiota and metabolic syndrome." *World journal of gastroenterology: WJG* 20.43 (2014): 16079.

FORSYTHE, Paul; BIENENSTOCK, John; KUNZE, Wolfgang A. Vagal pathways for microbiome-brain-gut axis communication. *Microbial endocrinology: the microbiota-gut-brain axis in health and disease*, p. 115-133, 2014.

FOSTER, Jane A.; RINAMAN, Linda; CRYAN, John F. Stress & the gut-brain axis: regulation by the microbiome. *Neurobiology of stress*, 2017, 7: 124-136.

FRENCH, Stephen; ROBINSON, Tristan. Fats and food intake. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 2003, 6.6: 629-634.

FRIEDRICH M. Global Obesity Epidemic Worsening. *JAMA*. 2017;318(7):603. doi:10.1001/jama.2017.10693

FURET, Jean-Pierre, et al. Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes*, 2010, 59.12: 3049-3057.

GAREAU, M. G. (2014). Microbiota-gut-brain axis and cognitive function. *Microbial endocrinology: The microbiota-gut-brain axis in health and disease*, 357-371.

GAREAU, M. G. Cognitive function and the microbiome. *International review of neurobiology*, 2016, 131: 227-246.

GAREAU, Mélanie G. Microbiota-gut-brain axis and cognitive function. *Microbial endocrinology: The microbiota-gut-brain axis in health and disease*, 2014, 357-371.

GAREAU, Mélanie G., et al. Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. *Gut*, 2011, 60.3: 307-317.

GHIBAUDI, Lorraine, et al. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of Sprague-Dawley rats. *Obesity research*, 2002, 10.9: 956-963.

GOMAA, Eman Zakaria. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2020, 113.12: 2019-2040.

GOMES, Aline Corado; HOFFMANN, Christian; MOTA, João Felipe. The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. *Gut microbes*, v. 9, n. 4, p. 308-325, 2018.

GOMES, Aline Corado; HOFFMANN, Christian; MOTA, João Felipe. The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. *Gut microbes*, 2018, 9.4: 308-325.

GÓMEZ-APO, Erick et al. Structural brain changes associated with overweight and obesity. *Journal of obesity*, v. 2021, 2021.

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, Margaret F.; HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual review of immunology*, 2011, 29: 415-445.

GUZZETTA, K. E., Cryan, J. F., & O'Leary, O. F. (2022). Microbiota-gut-brain axis regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Brain Plasticity*, 8(1), 97-119.

HARIRI, Niloofar; THIBAUT, Louise. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition research reviews*, 2010, 23.2: 270-299.

HEISS, Christina N.; OLOFSSON, Louise E. Gut microbiota-dependent modulation of energy metabolism. *Journal of innate immunity*, v. 10, n. 3, p. 163-171, 2018.

HENAO-MEJIA, J., Elinav, E., Jin, C., Hao, L., Mehal, W. Z., Strowig, T., ... & Flavell, R. A. (2012). Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*, 482(7384), 179-185.

HERSOU, Lars-Georg; MØLLER, Peter; LOFT, Steffen. Role of microbiota-derived lipopolysaccharide in adipose tissue inflammation, adipocyte size and pyroptosis during obesity. *Nutrition research reviews*, 2018, 31.2: 153-163.

HERSOU, Lars-Georg; MØLLER, Peter; LOFT, Steffen. Role of microbiota-derived lipopolysaccharide in adipose tissue inflammation, adipocyte size and pyroptosis during obesity. *Nutrition research reviews*, 2018, 31.2: 153-163.

HOBAN, Alan E., et al. Regulation of prefrontal cortex myelination by the microbiota. *Translational psychiatry*, 2016, 6.4: e774-e774.

JAIN, A., & Roy, P. (2023). Obesity and Alzheimer's: An attempt to decipher the role of obesity in blood–brain barrier degradation. *Chaos, Solitons & Fractals*, 166, 112902.

JIANG, Chunmei et al. The gut microbiota and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 58, n. 1, p. 1-15, 2017.

KANAI, Takanori; TERATANI, Toshiaki. Role of the Vagus Nerve in the Gut-Brain Axis: Development and Maintenance of Gut Regulatory T Cells via the Liver-Brain-Gut Vago-Vagal Reflex. *Brain and Nerve= Shinkei Kenkyu no Shinpo*, v. 74, n. 8, p. 971-977, 2022.

KANOSKI, S. E., & Davidson, T. L. (2011). Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiology & behavior*, 103(1), 59-68.

KAWAI, Tatsuo; AUTIERI, Michael V.; SCALIA, Rosario. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2021, 320.3: C375-C391.

KELLY, John R., et al. Lost in translation? The potential psychobiotic *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) fails to modulate stress or cognitive performance in healthy male subjects. *Brain, behavior, and immunity*, 2017, 61: 50-59.

KERRY, Rout George, et al. Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis*, 2018, 26.3: 927-939.

KHORUTS, Alexander; SADOWSKY, Michael J. Understanding the mechanisms of faecal microbiota transplantation. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 2016, 13.9: 508-516.

KOLB, Ryan; SUTTERWALA, Fayyaz S.; ZHANG, Weizhou. Obesity and cancer: inflammation bridges the two. *Current opinion in pharmacology*, 2016, 29: 77-89.

KÜSKÜ-KIRAZ, Zeynep, et al. Effects of betaine supplementation on nitric oxide metabolism, atherosclerotic parameters, and fatty liver in guinea pigs fed a high cholesterol plus methionine diet. *Nutrition*, 2018, 45: 41-48.

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.

LANDMAN, C., & Quévrain, E. (2015). Gut microbiota: Description, role and pathophysiologic implications. *La Revue de medecine interne*, 37(6), 418-423.

LEE, Patrick; YACYSHYN, Bruce R.; YACYSHYN, Mary B. Gut microbiota and obesity: An opportunity to alter obesity through faecal microbiota transplant (FMT). *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 21, n. 3, p. 479-490, 2019.

LEE, Patrick; YACYSHYN, Bruce R.; YACYSHYN, Mary B. Gut microbiota and obesity: An opportunity to alter obesity through faecal microbiota transplant (FMT). *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 21, n. 3, p. 479-490, 2019.

LEIGH, S. J., & Morris, M. J. (2020). Diet, inflammation and the gut microbiome: mechanisms for obesity-associated cognitive impairment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1866(6), 165767.

LERNER, Aaron; NEIDHÖFER, Sandra; MATTHIAS, Torsten. The gut microbiome feelings of the brain: a perspective for non-microbiologists. *Microorganisms*, v. 5, n. 4, p. 66, 2017.

LEY, R.E, Turnbaugh, P.J., Klein, S., Gordon, J.I. Human gut microbes associated with obesity. *Nature* volume 444, pages 1022–1023 (2006).

- LEY, Ruth E., et al. Human gut microbes associated with obesity. *nature*, 2006, 444.7122: 1022-1023.
- LI, Simone S., et al. Durable coexistence of donor and recipient strains after fecal microbiota transplantation. *Science*, 2016, 352.6285: 586-589.
- LIAO, Weiyao et al. Resveratrol-induced white adipose tissue browning in obese mice by remodeling fecal microbiota. *Molecules*, v. 23, n. 12, p. 3356, 2018.
- LYNCH, Susan V.; PEDERSEN, Oluf. The human intestinal microbiome in health and disease. *New England Journal of Medicine*, 2016, 375.24: 2369-2379.
- MAKAROVA, K., et al. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103.42: 15611-15616.
- MARGOLIS, Kara G.; CRYAN, John F.; MAYER, Emeran A. The microbiota-gut-brain axis: from motility to mood. *Gastroenterology*, 2021, 160.5: 1486-1501.
- MARTIN, Clair R.; MAYER, Emeran A. Gut-brain axis and behavior. In: *Intestinal microbiome: functional aspects in health and disease*. Karger Publishers, 2017. p. 45-54.
- MCCALL, M A et al. "Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 93,13 (1996): 6361-6. doi:10.1073/pnas.93.13.6361
- MILLER, Alyson A.; SPENCER, Sarah J. Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment. *Brain, behavior, and immunity*, 2014, 42: 10-21.
- MINEMURA M, SHIMIZU Y. Gut microbiota and liver diseases. *World J Gastroenterol* 2015; 21(6): 1691-1702
- MÖHLE, Luisa, et al. Ly6Chi monocytes provide a link between antibiotic-induced changes in gut microbiota and adult hippocampal neurogenesis. *Cell reports*, 2016, 15.9: 1945-1956.
- MOLINA-TORRES, Guadalupe et al. Stress and the gut microbiota-brain axis. *Behavioural pharmacology*, v. 30, n. 2, p. 187-200, 2019.
- MÖRKEL, Sabrina, et al. Probiotics and the microbiota-gut-brain axis: focus on psychiatry. *Current nutrition reports*, 2020, 9.3: 171-182.
- O'MAHONY, S. M., et al. Disturbance of the gut microbiota in early-life selectively affects visceral pain in adulthood without impacting cognitive or anxiety-related behaviors in male rats. *Neuroscience*, 2014, 277: 885-901.
- OHLAND, Christina L., et al. Effects of *Lactobacillus helveticus* on murine behavior are dependent on diet and genotype and correlate with alterations in the gut microbiome. *Psychoneuroendocrinology*, 2013, 38.9: 1738-1747.

- OTTOMAN, Noora, et al. The function of our microbiota: who is out there and what do they do?. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2012, 2: 104.
- 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.
- PATTERSON, E., Ryan, P. M., Cryan, J. F., Dinan, T. G., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2016). Gut microbiota, obesity and diabetes. *Postgraduate medical journal*, 92(1087), 286-300.
- PATTERSON, Elaine et al. Gut microbiota, obesity and diabetes. *Postgraduate Medical Journal*, v. 92, n. 1087, p. 286-300, 2016.
- PELLEGRINI, Carolina et al. Microbiota-gut-brain axis in health and disease: Is NLRP3 inflammasome at the crossroads of microbiota-gut-brain communications?. *Progress in neurobiology*, v. 191, p. 101806, 2020.
- PICHÉ, Marie-Eve; TCHERNOF, André; DESPRÉS, Jean-Pierre. Obesity phenotypes, diabetes, and cardiovascular diseases. *Circulation research*, 2020, 126.11: 1477-1500.
- POTTER, Gregory DM, et al. Nutrition and the circadian system. *British Journal of Nutrition*, 2016, 116.3: 434-442.
- 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
- RAMÍREZ, Viviana et al. Effect of exposure to endocrine disrupting chemicals in obesity and neurodevelopment: The genetic and microbiota link. *Science of The Total Environment*, p. 158219, 2022.
- RAO, Jingjing et al. Fecal microbiota transplantation ameliorates stress-induced depression-like behaviors associated with the inhibition of glial and NLRP3 inflammasome in rat brain. *Journal of Psychiatric Research*, v. 137, p. 147-157, 2021.
- ROMIJN, Amy R.; RUCKLIDGE, Julia J. Systematic review of evidence to support the theory of psychobiotics. *Nutrition reviews*, 2015, 73.10: 675-693.
- RUTSCH, A., Kantsjö, J. B., & Ronchi, F. (2020). The gut-brain axis: how microbiota and host inflammasome influence brain physiology and pathology. *Frontiers in immunology*, 11, 604179.
- RUTSCH, Andrina; KANTSJÖ, Johan B.; RONCHI, Francesca. The gut-brain axis: how microbiota and host inflammasome influence brain physiology and pathology. *Frontiers in immunology*, 2020, 3237.

SAAD, M. J. A.; SANTOS, A.; PRADA, P. O. Linking gut microbiota and inflammation to obesity and insulin resistance. *Physiology*, 2016.

SAKAKIBARA, Shoji et al. Acetic acid activates hepatic AMPK and reduces hyperglycemia in diabetic KK-A (y) mice. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 344, n. 2, p. 597-604, 2006.

SALAMI, M., & Soheili, M. (2022). The microbiota-gut-hippocampus axis. *Frontiers in Neuroscience*, 16.

SALAMI, Mahmoud. Interplay of good bacteria and central nervous system: cognitive aspects and mechanistic considerations. *Frontiers in Neuroscience*, 2021, 15: 25.

SAVIGNAC, H. M., et al. B ifidobacteria exert strain-specific effects on stress-related behavior and physiology in BALB/c mice. *Neurogastroenterology & Motility*, 2014, 26.11: 1615-1627.

SCHIPPA, S., & Conte, M. P. (2014). Dysbiotic events in gut microbiota: impact on human health. *Nutrients*, 6(12), 5786-5805.

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

SHI, Hang et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid–induced insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, v. 116, n. 11, p. 3015-3025, 2006.

SINGH, R.K., CHANG, HW., YAN, D. et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med* 15, 73 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1175-y>

SINGLA, Parul; BARDOLOI, Animesh; PARKASH, Anuj A. Metabolic effects of obesity: a review. *World journal of diabetes*, 2010, 1.3: 76.

SMITH, Peter Andrey, et al. The tantalizing links between gut microbes and the brain. *Nature*, 2015, 526.7573: 312-314.

SOLAS, M., MILAGRO, F. I., RAMIREZ, M. J., & MARTÍNEZ, J. A. Inflammation and gut-brain axis link obesity to cognitive dysfunction: plausible pharmacological interventions. *Current opinion in pharmacology*, v. 37, p. 87-92, 2017.

SONNENBURG JL, BACKHED F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature*. 2016;535(7610):56–64.

SOTO, Marion et al. Gut microbiota modulate neurobehavior through changes in brain insulin sensitivity and metabolism. *Molecular psychiatry*, v. 23, n. 12, p. 2287-2301, 2018.

- STERU, L., CHERMAT, R., THIERRY, B., AND SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*. 85, 367–370, 1985.
- STRANAHAN, Alexis M. Visceral adiposity, inflammation, and hippocampal function in obesity. *Neuropharmacology*, v. 205, p. 108920, 2022.
- SUÁREZ-ZAMORANO, N., Fabbiano, S., Chevalier, C., Stojanović, O., Colin, D. J., Stevanović, A., ... & Trajkovski, M. (2015). Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity. *Nature medicine*, 21(12), 1497-1501.
- SUEZ, J. et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*, London, v.0, no. 0, p.1-17, 2014.
- SUEZ, Jotham, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*, 2014, 514.7521: 181-186.
- TAKADA, M., et al. Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota relieves stress-associated symptoms by modulating the gut–brain interaction in human and animal models. *Neurogastroenterology & Motility*, 2016, 28.7: 1027-1036.
- TAN, B. L., & NORHAIZAN, M. E. (2019). Effect of high-fat diets on oxidative stress, cellular inflammatory response and cognitive function. *Nutrients*, 11(11), 2579.
- TANG, Wen, et al. "Roles of gut microbiota in the regulation of hippocampal plasticity, inflammation, and hippocampus-dependent behaviors." *Frontiers in cellular and infection microbiology* 10 (2021): 611014.
- TORRES-FUENTES, Cristina et al. The microbiota–gut–brain axis in obesity. *The lancet Gastroenterology & hepatology*, v. 2, n. 10, p. 747-756, 2017.
- TORRES-FUENTES, Cristina, et al. A natural solution for obesity: Bioactives for the prevention and treatment of weight gain. A review. *Nutritional neuroscience*, 2015, 18.2: 49-65.
- TSUKUMO, Daniela ML et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*, v. 56, n. 8, p. 1986-1998, 2007.
- TURNBAUGH, Peter J., et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *nature*, 2006, 444.7122: 1027-1031.
- VALDEARCOS, M., Myers Jr, M. G., & Koliwad, S. K. (2019). Hypothalamic microglia as potential regulators of metabolic physiology. *Nature Metabolism*, 1(3), 314-320.
- VIRTUE, Anthony T. et al. The gut microbiota regulates white adipose tissue inflammation and obesity via a family of microRNAs. *Science translational medicine*, v. 11, n. 496, p. eaav1892, 2019.

WALKER, W. Allan. Initial intestinal colonization in the human infant and immune homeostasis. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2013, 63.Suppl. 2: 8-15.

WALTER, Jens. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Applied and environmental microbiology*, 2008, 74.16: 4985-4996.

WANG, Hong-Xing; WANG, Yu-Ping. Gut microbiota-brain axis. *Chinese medical journal*, v. 129, n. 19, p. 2373, 2016.

WHO. World Health Organization. Obesity and overweight. 2018. Disponível em: < <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>

WU, Yanbei, et al. Interactions between food and gut microbiota: impact on human health. *Annual review of food science and technology*, 2019, 10: 389-408.

YOUNOSSI, Z. M., KOENIG, A. B., ABDELATIF, D., FAZEL, Y., HENRY, L. WYMER, M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016; 64: 73–84. doi:10.1002/hep.28431

ZHANG, Peng et al. Alterations to the microbiota–colon–brain axis in high-fat-diet-induced obese mice compared to diet-resistant mice. *The Journal of nutritional biochemistry*, v. 65, p. 54-65, 2019.

ANEXO A - DECLARAÇÃO DA CEUA



Universidade de Brasília

Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 26 de novembro de 2021.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "EFEITO DA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL NO METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO E FUNÇÃO COGNITIVA", SEI n.º 23106.110055/2021-87, sob responsabilidade da Professora Angélica Amorim Amato, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, na 165ª reunião ordinária, realizada em 26/11/2021. Este projeto foi aprovado para utilização de *Mus musculus* (C57/BL6, 60 machos), com procedência do biotério da Universidade Católica de Brasília. O presente certificado é válido pelo período de 15/01/2022 a 15/12/2023.



Carina Krewer

Dra. Carina da Costa Krewer

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.