

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM ANTIBIÓTICOS NÃO ABSORVÍVEIS NA
PLASTICIDADE SINÁPTICA EM RATOS *Wistar***

Suelen Marin Albino

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Schnorr

Co-orientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Porto Alegre

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM ANTIBIÓTICOS NÃO ABSORVÍVEIS NA
PLASTICIDADE SINÁPTICA DE RATOS *WISTAR***

Suelen Marin Albino

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Schnorr

Co-orientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carla Dalmaz (UFRGS)

Prof. Dr. Juciano Gasparotto (UFRGS)

Prof. Dr. Gertrudes Corção (UFRGS)

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Marin Albino, Suelen
Efeitos do tratamento com antibióticos não
absorvíveis na plasticidade sináptica de ratos Wistar
/ Suelen Marin Albino. -- 2021.
62 f.
Orientador: Carlos Eduardo Schnorr.

Coorientador: José Cláudio Fonseca Moreira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. antibióticos. 2. microbiota. 3. cérebro. 4.
plasticidade sináptica. I. Schnorr, Carlos Eduardo,
orient. II. Fonseca Moreira, José Cláudio, coorient.
III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e minha família por serem pessoas incríveis!

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Departamento de Bioquímica e especialmente um enorme agradecimento ao Lab. 32 e ao Prof Dr. José Cláudio Fonseca Moreira por me permitir usar sua estrutura para realizar o trabalho e aprender profissionalmente e pessoalmente

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Schnorr, meu orientador por me ajudar a ingressar nessa jornada e terminá-la, pelos muitos ensinamentos e compreensão

Aos colegas de Lab. 32, que foram amigos e colegas incríveis e me ajudaram em tudo que solicitei a eles. Vocês me ensinaram tanto. Sem vocês não teria conseguido! Muita gratidão a vocês!

Especialmente as minhas professoras de “blotting”, que me ajudaram muito Nauana e Carol e ao Prof. Dr. Daniel

Especialmente a minha colega Helen que me ajudou em todas as eutanásias de forma sempre muito proativa, gratidão!

Aos meus queridos colegas Doutores Juciano e Roberto por me ajudarem tanto nos momentos que mais me senti perdida e sem saber pra onde ir

À Prof. Dr.^a Maria Elisa Calcagnotto e seus alunos pela sempre gentil, paciente e acolhedora forma de me receber, me ajudando sempre que precisei, muita gratidão a vocês

Ao Prof. Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza e a Dr^a Fernanda Fontella pelas análises de HPLC e aceitarem me ajudar com essa parte

A Prof. Dr.^a Bibiana Araujo do departamento de farmacologia da UFRGS por me auxiliar na escolha dos medicamentos, dose e administração

Ao meu noivo Ari Queiroz por ser meu porto seguro e a pessoa que mais acredita em mim, e ter me dado o computador no qual escrevo essa dissertação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
1.1 MICROBIOTA INTESTINAL.....	7
1.2 EIXO MICROBIOTA-INTESTINO-CEREBRO.....	11
1.3 ANTIBIÓTICOS NO ESTUDO DA MICROBIOTA	13
2 PLASTICIDADE SINÁPTICA.....	13
2.1 NEUROTROFINAS E NEUROTRANSMISSORES	16
3 OBJETIVO GERAL.....	19
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4 METODOLOGIA.....	20
4.1 ANIMAIS.....	20
4.2 TRATAMENTO COM ANTIBIÓTICOS	21
4.3 NEUROELETROFISIOLOGIA	21
4.3.1 Implantação dos eletrodos de registro	21
4.4 NEUROQUÍMICA.....	23
4.4.1 Quantificação da liberação de neurotransmissores	23
4.4.2 Quantificação de sinaptofisina e neurotrofinas	24
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
6 RESULTADOS	28
6.1 TRATAMENTO COM ATB AFETA O CONSUMO ALIMENTAR E A RECUPERACAO DE PESO NO PÓS-CIRURGICO	28
6.2 TRATAMENTO COM ATB INDUZ UM AUMENTO DO IMUNOCONTEÚDO DE MARCADORES DE PLASTICIDADE SINÁPTICA EXCITATÓRIA NO CÓRTEX.....	30
6.3 TRATAMENTO COM ATB MODULA OS NEUROTRANSMISSORES NO ENCÉFALO	34
6.3.1 Tratamento com ATB induz alterações na liberação de gaba no córtex parietal...38	
7 DISCUSSÃO	41
8 CONCLUSÕES	50
9 PERSPECTIVAS.....	51
10 APOIO FINANCEIRO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53

RESUMO

Os microrganismos que habitam o intestino constituem uma complexa comunidade que interage com o hospedeiro e influenciam seu estado fisiológico e patológico através de suas atividades metabólicas. Já se observou que estes também influenciam o funcionamento do encéfalo e o comportamento através de mecanismos não totalmente elucidados. Neste sentido, as alterações na composição destas populações bacterianas no intestino, induzidas por antibióticos, probióticos, prebióticos ou transplante fecal de microbiota, ajudam a ilustrar as influências dessas comunidades. Por exemplo, elas já foram relacionadas com diversas desordens como Transtorno do Espectro Autista, Alzheimer, doença do intestino irritável, obesidade, depressão. Entender como a microbiota influencia o cérebro e seus impactos é de enorme importância para ajudar encontrar novas terapias direcionadas a estas doenças. O presente estudo tem como objetivo observar os impactos a nível proteico de marcadores envolvidos em sinapses (Sinaptofisina) excitatórias (PSD95) e inibitórias (gefirina), e nos níveis de neurotransmissores GABA e glutamato nas regiões do córtex pré-frontal, parietal e hipocampo de ratos Wistar machos adultos, após tratamento de 7 dias com antibióticos (ATBs) não absorvíveis (neomicina e vancomicina). Nossos dados indicam que a atuação dos ATBs sobre o microbioma foi capaz de provocar alterações nos níveis de marcadores de sinaptofisina e PSD95 no córtex parietal e pré-frontal. Além disso, o tratamento resultou em alterações nos níveis basais e pós estimulação de glutamato no córtex pré-frontal, enquanto no córtex parietal houve alteração na liberação de GABA em relação ao basal. Não se observou alterações significativas no hipocampo. Em resumo, nossos dados agregam evidências de que agentes capazes de induzir alterações na microbiota intestinal podem potencialmente afetar a neuroquímica e plasticidade neuronal.

ABSTRACT

The microorganisms that inhabit the intestine constitute a complex community that interacts with the host and influences its physiological and pathological state through its metabolic activities. It has already been observed that they still influence the functioning of the brain and behavior through mechanisms that have not been fully elucidated. Changes in the composition of these bacteria in the intestine, induced by antibiotics, probiotics, prebiotics or fecal microbiota transplant help to illustrate the influences of these communities and have been linked to several disorders such as Autistic Spectrum Disorder, Alzheimer, irritable bowel disease, obesity, depression . Understanding what influences the microbiota and its impacts is extremely important to help find new therapies targeting these diseases. The present study aims to observe the protein impacts of markers involved in synapses (Synaptophysin), excitatory (PSD95), inhibitory (Gefirina), and in the neurotransmitters GABA and glutamate in the regions of the prefrontal and parietal cortex and in the hippocampus of adult male Wistar rats after 7 days of treatment with non-absorbable antibiotics (ATBs) (neomycin and vancomycin). Our data indicate that the use of ATBs was able to cause changes in the levels of synapses and excitatory synapses (Synaptophysin and PSD95), in the parietal and prefrontal cortex. In addition to changes in baseline levels and after stimulation of high potassium medium, Glutamate in the prefrontal cortex, while in the parietal cortex there was a change in the percentage of GABA release compared to baseline. There were no significant changes in the hippocampus. In summary, our data add evidence that agents capable of inducing changes in the intestinal microbiota can potentially affect neurochemistry and neuronal plasticity.

LISTA DE ABREVIATURAS

TGI – Trato Gastrointestinal	AMPA – alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropríonico
SNC – Sistema Nervoso Central	TrK – Receptores tirosina kinase
SNP – Sistema Nervoso Parassimpático	RABV – <i>Rabies virus</i>
SNE – Sistema Nervoso Entérico	Wistar – <i>Rattus norvegicus</i>
ATM – Antimicrobiano	LPS – Lipopolissacarídeo
ATB - Antibiótico	ECoG - eletrocorticograma
GLU - Glutamato	CEUA – Comitê de Ética para o Uso de Animais
GABA – Ácido Gama-aminobutírico	CONCEA – Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento
SCFAs - <i>Short-chain fatty acids</i> (Ácidos-graxos de cadeia curta)	TEA – Transtorno do Espectro Autista
LTP – Long Term Potential ou Potencial de Longa Duração	SBCAL/COBEA – Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento
LTD – Long Term Depression (Depressão de longa Duração)	SBNeC – Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento
PSD95 – post synaptic density 95 protein (proteína de densidade pós sináptica)	IBRO – <i>International Brain Research Organization</i>
NGF – <i>Nerve Growth Factor</i>	CIOMS – <i>Council for International Organizations of Medical Sciences</i>
BDNF – <i>Brain-derived Neurotrophic Factor</i>	CREAL – Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório
NT-3 – <i>Neurotrophin-3</i>	
NMDA – N-metil-D-aspartato	

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: Peso e consumo alimentar em ratos controle (n=10) e ratos tratados com ATBs (n=10) após a cirurgia de implantação de eletrodos.....	29
Fig. 2: Western Blot de isolado de sinaptossoma da região do córtex parietal de ratos Wistar após 7 dias de tratamento com ATBs.....	31
Fig. 3: Western Blot de isolado de sinaptossoma da região do córtex pré-frontal de ratos Wistar após 7 dias de tratamento com ATBs.....	32
Fig. 4: Western Blot de isolado de sinaptossoma da região do hipocampo de ratos Wistar após 7 dias de tratamento com ATBs.....	33
Fig. 5: Concentração de glutamato (GLU) e ácido gama-aminobutírico (GABA) em sinaptossomas do córtex parietal de ratos Wistar após 7 dias de tratamento com ATBs..	35
Fig. 6: Concentração de glutamato (GLU) e ácido gama-aminobutírico (GABA) em sinaptossomas do córtex pré-frontal de ratos Wistar após 7 dias de tratamento com ATBs..	36
Fig. 7: Concentração de glutamato (GLU) e ácido gama-aminobutírico (GABA) em sinaptossomas do hipocampo de ratos Wistar após 7 dias de tratamento com ATBs.....	37
Fig. 8: Cálculo da liberação dos neurotransmissores, GABA e glutamato em relação ao basal no córtex pré-frotal, parietal e hipocampo.	39
<i>Fig. 1: Resumo Ilustrativo dos Resultados.....</i>	<i>40</i>

1 INTRODUÇÃO

O conjunto de microrganismos que habitam o corpo humano, utilizando seus órgãos e tecidos como micro-ecossistemas, é chamado de microbiota ou microbioma, ou ainda microbioma humano. Dentro deste grupo estão incluídas bactérias, *archeas*, fungos e vírus. No entanto, com os recursos tecnológicos atuais a maior parte dos estudos que surgem tem como foco principal a caracterização das populações bacterianas. Estas são encontradas tanto em superfícies externas, como internas, tais como a pele, como internas, tais como o trato gastrointestinal (TGI), trato genital e urinário, trato respiratório, cavidade oral, ou conjuntivas¹.

A dimensão de seu impacto se torna clara quando se percebe que estes microrganismos são inclusive mais abundantes e diversos que o número de células humanas (1,3 células bacterianas para cada célula humana)^{1,2} no nosso organismo. Além disso, seu genoma como um todo contém mais genes que o genoma humano, existindo de 500-1000 espécies de bactérias diferentes em um indivíduo. Igualmente surpreendente é o fato que a composição dessas populações é única para cada indivíduo, variando consideravelmente dentro de uma taxa conservada. Entretanto, atualmente não entendemos completamente como essas variações atuam nos estados de saúde ou progressão e desenvolvimento de doenças através de seu metabolismo ou interação com o hospedeiro².

Parte importante da relação entre microbiota e hospedeiro está nas interações entre os microrganismos e o sistema imune do seu hospedeiro. Hoje se sabe que a resposta imune do hospedeiro age na modulação da microbiota e também é modulada por ela². Tem sido proposto ainda por alguns cientistas que a microbiota e o

hospedeiro seriam mais que componentes isolados em um ecossistema e formariam um holobionte, um tipo de “super-organismo”, onde os microrganismos oferecessem uma extensão do genoma humano, sendo uma simbiose intrincada mesmo a nível de proteoma e da metaboloma³. Enquanto há poucas variações no genoma humano entre os indivíduos a variação genética do microbioma é muito maior⁴. Portanto, parece evidente que os hospedeiros se beneficiam de uma série de funções extras que esses microrganismos oferecem, como a digestão de macronutrientes complexos, a produção de enzimas e co-fatores, a proteção competitiva contra patógenos e a maturação e manutenção do sistema imunológico. Em troca o hospedeiro oferece um ambiente estável para o microrganismo proliferar⁵.

Embora nossa relação com os microrganismos seja antiga e forjada durante todo o processo de evolução, foi somente na última década que se intensificaram as pesquisas sobre a relação entre microbiota e o comportamento, cérebro, sistema imune e saúde do hospedeiro. Já era descritos em condições patológicas alguns casos de como microrganismos pequenos e unicelulares podem alterar o comportamento de grandes hospedeiros mamíferos, como no caso do *Rabies vírus* (RABV), o vírus clássico da raiva, e do *Toxoplasma gondii*, e para isso, consequentemente influenciam o SNC⁶. Neste último exemplo, o *Toxoplasma* altera o comportamento de medo dos roedores infectados, levando o animal a sentir forte atração pelo odor de felinos (predador). Existem variados exemplos semelhantes, em geral, o parasita ou microrganismo altera as preferências do hospedeiro a fim de dar sequência ao seu ciclo reprodutivo^{6,7}. Da mesma maneira que esses microrganismos parasitas, os simbiotes também vem se mostrando capazes de modular a resposta imune do hospedeiro, a neuroquímica e outras características fenotípicas e

comportamentais^{8,9}. Em especial, tem se tornado evidente e destacado a influência dos microrganismos que habitam o intestino.

1.1 MICROBIOTA INTESTINAL

O intestino é o local do corpo onde se encontra o maior número de bactérias¹⁰, onde há maior interação do sistema imune, o maior número de células neuronais e a maior produção de “moléculas neurotransmissoras” fora do Sistema Nervoso Central (SNC). Em comparação, o intestino delgado e estômago apresentam quantidades menores de bactérias, sendo no cólon que se encontram as populações mais numerosas.

Como resultado, o intestino é um dos “ecossistemas” envolvidos com a microbiota com mais destaque na avalanche de pesquisas deste campo nos últimos anos. Campo este que se beneficiou com o refinamento de técnicas de sequenciamento genômico permitindo a identificação de bactérias que antes eram de cultivo penoso ou impossível. Usando métodos de sequenciamento e o gene ribossomal 16S RNA, o Projeto Microbioma Humano em 2013 completou a primeira caracterização da microbiota em cinco principais regiões do corpo humano de indivíduos saudáveis, incluindo o intestino¹¹.

A microbiota intestinal varia entre as espécies, entre os indivíduos da mesma espécie e ao longo da vida. Os quatro filos predominantemente encontrados na espécie humana são: Firmicutes (Gram-positivos), Bacteroidetes (Gram-negativos), Actinobactéria (Gram-positivos) e Proteobactéria (Gram-negativos)³, que variam em proporções e espécies constituintes. Contudo, é importante ressaltar, que mesmo

havendo uma grande variação da composição de bactérias entre os indivíduos, o perfil de genes funcionais e grupos enzimáticos produzidos pode ser similar¹².

A colonização do bebê ocorre de forma vertical, a partir dos vários locais do corpo materno. Estudos recentes sugerem que a colonização se iniciaria ainda na vida intrauterina, continuando no pós-parto. Apesar de estudos controversos sobre o tema, há uma forte associação com a microbiota materna e a maturação imune do feto, no recém-nascido e na sua microbiota inicial^{13,14}. No parto, os primeiros colonizadores são as bactérias da vagina e do TGI materno, enquanto no nascimento por cesárea isso não ocorre, e o contato com a pele, os médicos e enfermeiros, além do ambiente constituem o início da colonização. Nos primeiros anos a microbiota será pouco diversa e instável, sendo influenciada pela amamentação, dieta, convívio com animais de estimação, infecções e uso de antibióticos¹⁵. Adicionalmente, as primeiras bactérias podem moldar a histologia do intestino, por modulação de expressões de genes nestes tecidos e favorecer seu próprio crescimento e impedir o estabelecimento de outras cepas, sendo assim, a colonização inicial é muito importante para determinar a composição da microbiota adulta¹⁶.

Esses simbiontes tem um papel importante para funções metabólicas, como na produção de vitaminas e cofatores essenciais para absorção de nutrientes da dieta. Eles também regulam a mucosa e a permeabilidade intestinal, estimulam o desenvolvimento do sistema imune, influenciam o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e são uma barreira contra colonização de patógenos.

Entretanto, a microbiota pode causar influência positiva ou negativa envolvendo estes aspectos. A maior fonte de energia para as células epiteliais intestinais é o butirato um ácido-graxo de cadeia curta* (*Short-chain fatty acids*, SCFAs) produzido

*Embora na literatura se ache essa denominação, o butirato é, na verdade, um ácido carboxílico de cadeia curta.

pela microbiota a partir de fibras insolúveis ingeridas na dieta¹⁰. Tem sido demonstrado que uma dieta rica nestas fibras possui benefícios metabólicos e fenotípicos através dos SCFAs,^{17,18,19,20,21,22} os quais não são apenas moduladores epigenéticos alterando acetilação de histonas, mas também se ligam a receptores acoplados a Proteína G de uma gama de células e tipos de tecidos^{23,24,25}. Mas as substâncias liberadas no lúmen intestinal pelas bactérias podem ter influências negativas no organismo do hospedeiro, como o aumento de lipopolissacarídeos (LPS) derivado da membrana de bactérias gram-negativas. O LPS é uma endotoxina que pode provocar uma resposta imune exagerada, que possui efeito tanto local como pode atuar sistemicamente.

O aumento da permeabilidade intestinal pode facilitar a maior absorção de antígenos como este contribuindo para quadros de diversas patologias associadas¹⁶. Tanto a dieta como a microbiota são alguns dos principais fatores que influenciam na permeabilidade intestinal²⁶. Estudos já demonstraram que a administração de *Bifidobacteria* promove a melhora do mucosa intestinal prevenindo translocação bacteriana, enquanto as bactérias patogênicas tendem a degradar as glicoproteínas que constituem o muco prejudicando as microvilosidades intestinais^{16,27,28}.

As alterações nas comunidades bacterianas intestinais que provocam uma resposta adversa no hospedeiro são chamadas de disbioses e estão implicadas em uma gama de sintomas e quadros patológicos.²⁹ Muitos dados e estudos atuais vem demonstrando que alterações na composição da microbiota estão relacionadas, pelo menos em parte, na fisiopatologia de vários distúrbios no estado de saúde do hospedeiro, como desordens metabólicas,^{30,31} doença do intestino irritável,^{32,33} doença de Chron,³⁴ doença de *Parkinson*,^{20,35} doença de Alzheimer,³⁶ Transtorno do Espectro Autista (TEA),^{37,38} diabetes tipo 2, doenças crônicas e autoimunes.³⁹

Atualmente, vários estudos também sugerem que a microbiota participa da modulação neuroquímica e comportamental^{8,38,40,41,42}.

A microbiota intestinal é formada pela influência do hospedeiro, através do sistema imune e por pressões ambientais, que são os mais diversos. Na infância há muita importância do modo de amamentação, tipo de parto e convivência com animais de estimação. Já na vida adulta se tem observado que a dieta tem uma ampla participação, assim como o estilo de vida, o uso de tabaco, privação de sono, estresse, cirurgias e uso de antibióticos. Por exemplo, Fillipo *et al.* analisaram e compararam a microbiota fecal de crianças de uma vila rural na África, que possuem uma dieta a base de fibras e crianças vivendo na região da Europa, e os resultados demonstraram diferenças significativas entre os dois grupos. Além disso, a dieta rica em fibras demonstrou um enriquecimento das Bacteroidetes, aumentando assim a produção de SCFA, e diminuindo as bactérias patogênicas como *E. coli*, quando comparadas a crianças com dietas mais ocidentais na região Européia⁴³.

Contudo, podemos questionar: como a microbiota intestinal pode se manter em um padrão “saudável” com tantos fatores podendo influenciá-la? Para isso é necessário que a microbiota possa manter uma certa estabilidade, e para alcançar esta estabilidade é preciso possuir alguma *resistência* a pressões “ambientais”, ou possuir mecanismos de homeostase para promover a retomada de seu equilíbrio após a retirada do evento agressor, os quais são alguns conceitos bem difundidos na ecologia microbiana^{29,44}. Portanto, a microbiota saudável precisa ser robusta e, paradoxalmente, também necessita ter um dinamismo para que mesmo havendo alterações em sua composição, as vias metabólicas sustentadas por estas bactérias se mantenham similares.

Se tratando, de alterações da microbiota também é importante diferenciar alguns conceitos relacionados a análises destas mudanças. Duas ou mais populações bacterianas vivendo no mesmo ambiente podem ser chamadas de comunidade. A ecologia microbiana pode ser analisada tanto quanto a sua riqueza como por sua diversidade e outras tantas variáveis ecológicas em um determinado local ou amostra. Neste sentido, a riqueza se refere ao número de espécies diferentes presentes naquela comunidade bacteriana (qualitativo), enquanto a diversidade é um índice matemático que leva em consideração a riqueza (quais espécies estão presentes) e a abundância de cada espécie na comunidade. A abundância relativa é outra variável, geralmente representada visualmente em mapas de calor, ela é usada para comparar semelhanças entre comunidades bacterianas e até grupos com tratamentos diferentes⁴⁵.

1.2 EIXO MICROBIOTA-INTESTINO-CEREBRO

Os microrganismos que vivem de forma simbiote no lúmen intestinal de humanos e animais são parte de um complexo eixo de comunicação bidirecional chamado eixo microbiota-intestino-cérebro. Nessa relação a microbiota confere múltiplos benefícios ao seu hospedeiro, mas também pode estar relacionada a condições patológicas⁴⁶. Além disso, têm sido observado que a microbiota influencia o cérebro durante toda a vida do indivíduo, fornecendo alguns metabólitos exclusivos e essenciais, mas é no início e no fim da vida onde ela tem o seu maior impacto quando alterada, tendo consequências neurológicas, mentais e comportamentais⁴⁷. Neste sentido, várias pesquisas recentes têm demonstrado que mudanças na composição da microbiota intestinal são capazes de afetar o comportamento e a

fisiologia do encéfalo de humanos e roedores⁷, sua neurogenese⁴⁸, e a interação entre SNC e SNE⁴⁹. Entretanto, os mecanismos exatos envolvidos nesta comunicação do eixo microbiota-encéfalo ainda não são completamente compreendidos.

As evidências de estudos com animais e humanos indicam que esta comunicação pode envolver a produção de hormônios, fatores imunes e metabólitos⁷. Além disso, sabe-se que a microbiota intestinal é capaz de produzir uma grande quantidade de transmissores, neuromoduladores ou seus precursores, como por exemplo, o ácido gama-aminobutírico(GABA), o qual é o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central⁵⁰, e a absorção de triptofano que, produzido pela microbiota, regula tanto os sistemas serotoninérgico quanto glutamatérgico⁵¹. Sabe-se ainda que outros neurotransmissores, como a acetilcolina, a norepinefrina e a dopamina, também são produzidos pela microbiota intestinal⁶. Esta produção de neurotransmissores parece possuir um papel chave na comunicação entre componentes da microbiota e também exercer importante influência sobre o encéfalo⁵².

Por fim, o intestino recebe também inervações do Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNS) e Parassimpático (SNP), que se comunicam com o Sistema Nervoso Entérico (SNE), tendo o Nervo Vago como uma via chave nessa comunicação. O Nervo Vago é um nervo craniano aferente e eferente e uma via direta entre o intestino e o encéfalo. Já foi observado, por exemplo, que a vagotomia em roedores impacta a neurogenese adulta^{53,54}.

1.3 ANTIBIÓTICOS NO ESTUDO DA MICROBIOTA

Atualmente, diversos modelos experimentais são utilizados para estudar a influência da microbiota intestinal sobre o encéfalo. Alternativas incluem estudos com animais *germ-free*, estudos com antibióticos ou probióticos, modelos de infecções ou com transplantação fecal⁵². Estudos utilizando antibióticos tem sido especialmente importante na pesquisa sobre os efeitos da perturbação da microbiota intestinal em casos onde há limitações estruturais ou acesso limitado a animais *germ-free*⁵⁵. Neste sentido, a administração oral de um coquetel de antimicrobianos não-absorvíveis (ATMs) é considerado um modelo experimental eficiente e consolidado na literatura. Sabe-se que a administração de ATMs para roedores convencionais induz alterações na composição da microbiota e alterações comportamentais. Estas alterações induzidas pelos ATMs são acompanhadas por alterações nos níveis de BDNF no hipocampo, sugerindo que mecanismos centrais dependentes de neurotrofinas estejam envolvidos na indução das alterações no comportamento observadas⁴⁰.

2 PLASTICIDADE SINÁPTICA

O termo plasticidade foi introduzido em 1930 por um fisiologista alemão chamado Albrecht Bethe e significa a capacidade do organismo em se adaptar as mudanças externas e internas. Já o termo de plasticidade sináptica foi introduzido mais tarde, em 1996, pelos trabalhos de Santiago Ramón y Cajal e Eugenio Tanzi. O termo se refere ao mecanismo que os cérebros de mamíferos usam para manter a conexão de uma rede de neurônios em constante transformação. Desde então a

plasticidade sináptica ou a modificação dos circuitos neuronais tem sido proposta como um mecanismo fundamental e básico usado pelo cérebro para reter informações. As modificações sinápticas ocorrem a partir de uma resposta ao ambiente ou á uma modificação da própria rede de neurônios⁵⁶.

As sinapses podem ser alteradas em relação a sua força ou eficiência da transmissão sináptica, e esses processos são dependentes da ativação neuronal. Essas modificações ocorrem durante o desenvolvimento do SNC e na sua fase adulta. É atribuído a elas a capacidade do encéfalo transformar experiências em aprendizados e memórias de curto e longo prazo. Algumas das regiões do encéfalo dos mamíferos essenciais para esse processo de armazenamento de memória, são o córtex pré-frontal e o hipocampo. Entre eles, o córtex pré-frontal é responsável pela memória de trabalho. Já no hipocampo essa memória pode ser levada a uma memória de longa-duração e mais estável, que pode se manter por toda a vida do indivíduo. Ainda, acredita-se que destino de armazenamento de memórias seja o córtex cerebral⁵⁶.

Já analisando o fenômeno da plasticidade no “microcosmo” das sinapses nessas regiões citadas, observa-se que são os espinhos dendríticos, localizados nos terminais sinápticos, uma das estruturas menores mais importantes deste processo, sendo muito plásticos. Eles são muito pequenos, podendo haver milhares de espinhos em um dendrito, contendo receptores, canais, sistemas de sinalizações intracelulares, proteínas de citoesqueleto e neurotrofinas essenciais para a atividade sináptica. Por isso, possuem várias funções como: a transmissão sináptica, a memória, o aprendizado, manter os níveis de cálcio intracelular seguros e aumentar o número de pontos de contato entre os neurônios. Sendo muito dinâmicos e móveis, mudando de forma, volume e número em um tempo bem curto, os espinhos geralmente recebem

input de apenas um axônio na sinapse, recebendo destes axônios informações excitatórias ou excitatórias e inibitórias⁵⁶.

Muitas formas de plasticidade sináptica já foram descritas. Em uma mesma sinapse pode ocorrer variadas formas de plasticidade, resultando em aumento ou depressão desta por estímulos de despolarização. Muitas têm em comum o aumento de cálcio intracelular desencadeando cascatas metabólicas, gerando mensageiros intracelulares como cAMP, que irão modificar a célula pré e/ou pós-sináptica, modificar a expressão gênica, causando o aumento da liberação de neurotransmissores ou modificando os receptores em número ou tipo, ou criando novas conexões sinápticas. No hipocampo, por exemplo, a memória depende de dois processos chamados de Potenciação de Longa Duração (LTP) e Depressão de longa Duração (LTD), as quais ambas modificam a eficiência sináptica^{57,58}.

A LTP é uma gama de processos que compartilham similaridades. Ela pode ser induzida por estímulos de alta frequência. É bem descrito que para ocorrer a LTP deve haver a ativação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) pós-sinápticos, que são receptores ionotrópicos ativados por glutamato e proporcionam o aumento de íons Ca^{2+} intracelular. Em resumo, durante uma despolarização, o glutamato pré-sináptico é liberado e interage com os receptores alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) na membrana pós-sináptica. Este receptor permite a passagem de íons (Na^+)(K^+), causando a despolarização da membrana e posteriormente há a liberação do íon (Mg^{2+}) que bloqueia fisicamente o receptor NMDA. Esse por sua vez é também permeável aos íons Ca^{2+} que irão aumentar mensageiros intracelulares e ativar vias de sinalização que levarão a modificações como aumento dos receptores AMPA na membrana. Os estímulos que iniciam uma

LTP podem alterar a liberação de neurotransmissores, ou a sensibilidade a esses neurotransmissores na célula pós-sináptica⁵⁸.

Enquanto a LTP é geralmente induzida por um estímulo de alta frequência e aumenta o número e, algumas vezes a composição dos receptores AMPA na membrana, o LTD depende de um estímulo de baixa frequência (1Hz), mas em períodos prolongados para ocorrer, tendo como resultado a diminuição do número de receptores ionotrópicos AMPA na membrana pós-sináptica. Embora receba menos destaque, a plasticidade envolvendo as sinapses gabaérgicas também contribui para o refinamento da rede neuronal através do balanço inibitório/excitatório. Da mesma maneira, ela é dependente de ativação e há uma gama de formas diferentes que ocorrem em diferentes regiões do encéfalo. Os processos de plasticidade inibitória também são denominados de Potenciação de Longa Duração (I-LTP) e Depressão de Longa Duração (I-LTD) e resultam em aumento da liberação pré-sináptica de GABA ou no número e afinidade dos receptores de GABA⁵⁹.

2.1 NEUROTROFINAS E NEUROTRANSMISSORES

A plasticidade sináptica pode ser influenciada negativamente por diversos fatores como o envelhecimento, o estresse e a inflamação^{60,61}. Além disso, atualmente muitos estudos vem descobrindo associações entre as modificações da microbiota intestinal e plasticidade sináptica⁶². No trabalho de Buffington *et al.*, (2016), foi demonstrado como uma única cepa bacteriana restaura a produção de ocitocina, o LTP em células do hipocampo e os prejuízos no comportamento de camundongos com déficits no comportamento social³⁸. Frolich *et al.* (2016) demonstrou que após uma disbiose causada por ATBs, camundongos tem a expressão de NMDA e BDNF

alteradas assim como prejuízos nos testes cognitivos de reconhecimento de objeto⁶³. Darch *et al.* 2021, por sua vez, observou que em animais germ-free são necessários mecanismos compensatórios para manter a LTP ocorrendo de forma homeostática⁶⁴. Nesse contexto, há motivações promissoras a fim de avaliar as modificações em parâmetros tanto de plasticidade sináptica excitatórias quanto inibitórias, após a perturbação da microbiota pelo uso de ATMs.

Há diversas maneiras de avaliar a plasticidade sináptica do SNC frente uma condição fisiológica ou patológica, uma destas formas é usando marcadores bioquímicos analisados a partir de isolados de sinaptossoma. Uma das proteínas sinápticas importantes para a plasticidade e que se encontram no sinaptossomas é a sinaptofisina, uma proteína estrutural pré-sináptica, usada como um marcador típico de sinapses. Outras proteínas importantes incluem uma proteína estrutural pós-sináptica de sinapses inibitórias chamada Gefirina e uma proteína estrutural pós-sináptica de sinapses excitatórias chamada *postsynaptic density-95* (PSD95). Ambas, proteínas, PSD95 e Gefirina, são essenciais no estabelecimento das sinapses, na formação das estruturas pós-sinápticas, aumentando o tamanho e o número de espinhos dendríticos. Estas se ligam a uma grande gama de proteínas como receptores, proteínas das cascatas intracelulares iniciadas pelo neurotransmissor, e ao citoesqueleto. Tendo em vista as importantes funções que desempenham, variações destas proteínas podem levar a mudanças no número e no tamanho das sinapses excitatórias e inibitórias, correspondentes^{65,66,67,68}.

Também se sabe que as neurotrofinas possuem um papel importante nos variados processos de plasticidade sináptica no SNC. As neurotrofinas são uma família de proteínas, entre as quais as mais conhecidas são as Fator de Crescimento Nervoso do inglês *nerve growth fator* (NGF), Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

do inglês brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3). Elas são secretadas em pró-neurotrofinas e interagem com duas classes de receptores, os receptores tirosina kinase (Trk), os quais se ligam com alta afinidade, e os receptores p75, os quais se ligam com baixa afinidade, iniciando uma série de reações celulares e funções biológicas. Tanto as neurotrofinas quanto seus receptores necessariamente precisam estar presentes na sinapse para ocorrer a plasticidade sináptica^{69,70}.

O BDNF possui uma influência direta na plasticidade sináptica, em ambas estruturas pré e pós-sináptica, regulando o crescimento, sobrevivência e funções neuronais, aumentando a secreção de neurotransmissores ou fosforilando o receptor NMDA e ajudando a aumentar os níveis intracelulares de Ca^{2+} ⁷¹. Adicionalmente, os mesmos estímulos de alta frequência que produzem LTP no hipocampo induzem a expressão de BDNF⁷². Também se sabe que o BDNF é regulado pela microbiota e alguns trabalhos já demonstraram que ratos e camundongos *germ-free*, ratos tratados com probióticos ou ratos tratados com ATMs apresentam níveis reduzidos ou aumentados de BDNF^{73,40,74}. Os locais de expressão e atuação do BDNF são similares, nos cérebros de roedores, aos locais de expressão da neurotrofina NGF. Esta por sua vez também possui uma importante participação para o crescimento e sobrevivência dos neurônios, e ela já foi associada a desordens do SNC como doença do espectro autista e doenças neurodegenerativas⁷⁵.

3 OBJETIVO GERAL

Portanto, o objetivo do nosso estudo foi avaliar a plasticidade sináptica em ratos Wistar adultos após a modulação da microbiota intestinal pela administração de antibióticos não absorvíveis (ATBs).

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as mudanças no padrão de liberação de glutamato e GABA no hipocampo, córtex frontal e parietal induzidas após a administração de ATBs em ratos Wistar adultos, através do isolamento dos sinaptossomas e quantificação dos neurotransmissores por HPLC;

- Avaliar as alterações nos níveis de marcadores de plasticidade sináptica através do isolamento dos sinaptossomas e quantificação do imunoconteúdo de proteínas por Western blot no hipocampo, córtex frontal e parietal (sinaptofisina, PSD95, Gefirina, BDNF, NGF) após a administração de ATBs em ratos Wistar adultos.

4 METODOLOGIA

O projeto foi submetido e aprovado pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (Nº 33642). Todos os procedimentos experimentais foram realizados obedecendo a Lei nº 11.794/2008, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei No 11.794, 8 de outubro de 2008), as recomendações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), da *International Brain Research Organization* (IBRO), do *Council for International Organizations of Medical Sciences* (CIOMS) e da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA). Também se respeitou a resolução nº 879, de 15 de fevereiro de 2008, e a prática dos 3 “R’s” da experimentação animal: *replace*, *reduce* e *refine*, conforme a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos” do CONCEA (DBCA/2013).

4.1 ANIMAIS

Foram obtidos 22 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) adultos machos (60 dias; 300-350g) fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório - CREAL (Porto Alegre, RS - UFRGS). Os animais foram alojados durante todos o período experimental no Biotério do Departamento de Bioquímica na Universidade Federal do Rio Grande do Sul distribuídos em grupos de 4 animais por caixa-lar. As caixas-lar eram feitas de propileno (dimensões 41x34x16cm) e os animais foram mantidos ao longo de toda fase experimental com livre acesso à ração padrão e água, em condições ambientais controladas (ciclos de 12h/12h claro/escuro;

temperatura de $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$). O peso dos animais, assim como o consumo de comida, foi monitorado diariamente durante o período de intervenção. Toda a equipe envolvida no projeto possui experiência no manejo adequado dos animais.

4.2 TRATAMENTO COM ANTIBIÓTICOS⁴⁰

Após a implantação dos eletrodos de registro do ECoG os animais foram subdivididos em dois grupos experimentais. Um dos subgrupos recebeu doses diárias (0,5 mL) de uma solução aquosa contendo antibióticos (ATBs) não absorvíveis, neomicina (260mg/mL - Cayman Chemical) e vancomicina (12mg/mL - ABL - Antibióticos do Brasil) via gavagem por 7 dias; as soluções eram preparadas frescas, diariamente. O outro subgrupo (controle) recebeu gavagem apenas com veículo.

4.3 NEUROELETROFISIOLOGIA

4.3.1 implantação dos eletrodos de registro^{76,76}

A implantação dos eletrodos foi realizada após o período de aclimação (1 semana) e habituação ao procedimento de manipulação (1 semana). Os animais foram inicialmente anestesiados (cetamina 100mg/kg, xilazina 10mg/kg i.p) e fixados no estereotáxico. O crânio foi exposto e foram realizadas 7 pequenas trepanações (4 eletrodos, 1 referência e 2 parafusos). A implantação de 4 eletrodos subdurais de registro de aço inox (diâmetro=1mm) foi realizada sobre o córtex frontal e parietal, um para cada lado do hemisfério cerebral conforme as coordenadas da tabela abaixo (Tabela 1). As coordenadas foram situadas a partir do bregma. Um eletrodo de referência foi implantado no occipital. Dois parafusos (diâmetro=1mm) foram inseridos na parte ventral do crânio para aterramento. Todos os eletrodos foram fixados com

cimento acrílico dentário. Após a cirurgia, os animais foram alojados individualmente em caixas-lar limpas e a recuperação monitorada diariamente até o registro do eletrocorticograma (ECoG). Todos os animais tiveram 7 dias de recuperação e isolamento até o dia do registro do ECoG. As cirurgias foram realizadas na Sala de Cirurgias e a recuperação na Sala de Pós-operatório, ambas localizadas no Departamento de Bioquímica.

Tabela 1. Coordenadas para implantação de eletrodos usando sistema estereotáxico.

Coordenadas	X	Y
Eletrodo 1 (Córtex Pré-frontal)	+ 2.0	+ 3.2
Eletrodo 2 (Córtex Pré-frontal)	- 2.0	+ 3.2
Eletrodo 3 (Córtex Parietal)	+ 2.2	- 3.6
Eletrodo 4 (Córtex Parietal)	- 2.2	- 3.6

Os registros de Eletrocorticograma (VÍDEO-ECoG) foram realizados após o último dia de tratamento com os antimicrobianos. No dia de realização dos registros de ECoG os animais foram transferidos para uma caixa de observação e os eletrodos conectados a um sistema de aquisição de sinais acoplado a um sistema de vídeo (MAP32, Plexon Inc., EUA). Cada animal foi registrado e filmado por um período total de 12h. Todos os registros adquiridos foram filtrados, digitalizados e armazenados para posterior análise utilizando o MATLAB (Mathworks®, EUA) para detectar diferenças nos padrões de oscilações cerebrais em períodos de atividade/inatividade e períodos de sono/vigília^{53,76}. Essas análises não serão apresentadas nesta dissertação, pois fazem parte de outro projeto.

4.4 NEUROQUÍMICA

Os animais foram decapitados por guilhotina após os registros eletrofisiológicos e os cérebros foram removidos. O córtex cerebral de cada animal foi isolado e subdividido nas regiões de interesse. Cada região foi pesada e homogeneizada em tampão sacarose (sacarose 0,32M, EDTA mM, DTT 0,25mM), sendo adicionado volume equivalente a 10X o peso da estrutura. O homogeneizado foi centrifugado (10min, 4°C, 1000g) e o sobrenadante (S1) coletado. O pellet foi re-suspendido em metade do volume anterior de tampão sacarose e novamente centrifugado (10min, 4°C, 1000g). O sobrenadante (S2) foi coletado, adicionado ao S1 e centrifugado (20min, 4°C, 11000g). O sobrenadante foi desprezado e o pellet re-suspendido em 1mL de tampão HBSS baixo potássio (do inglês – Hank's Buffered Salt Solution) e centrifugado (2min, 4°C, 16000g) para remoção da sacarose, e esta etapa foi repetida. O sobrenadante foi desprezado e o pellet re-suspendido em meio com baixa concentração de potássio, que não provoca a despolarização da membrana celular (meio não despolarizante: tampão HBSS, baixo potássio) (600µL de tampão). O volume de 200 µL desse re-suspendido foi armazenado a -20°C para posterior análise do imunoconteúdo proteico por Western blot. E o restante de sinaptossoma (400 µL) foi utilizada para a quantificação da liberação dos neurotransmissores por HPLC.

4.4.1 Quantificação da liberação de neurotransmissores⁷⁷

Um volume de 100µl de sinaptossoma foi pipetado em 900µl de meio não despolarizante (HBSS com baixo potássio) ou meio com alta concentração de potássio que causa a despolarização da membrana celular (meio despolarizante: HBSS com alto potássio) em duplicata e incubados por 1min a 37°C, seguido por centrifugação (1min, 4°C, 14000g). O sobrenadante (500 µl) foi coletado para posterior

análise por HPLC. Uma alíquota do sinaptossoma foi utilizada após o isolamento para a quantificação da liberação de GABA e glutamato. A liberação dos neurotransmissores foi realizada por despolarização com alta concentração de potássio nos sinaptossomas e quantificada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). As amostras foram derivatizadas com 2-mercapto-etanol e o-ftaldialdeído e foi utilizada uma coluna de fase reversa (Supelcosil LC-18, 250mm×4,6mm, Supelco) em um cromatógrafo líquido Shimadzu (válvula de injeção em laço 40µL). A fase móvel flui a taxa de 1,4mL/min em temperatura da coluna de 25°C. As composições dos tampões eram A: tampão fosfato de sódio monoidratado 0,01 mol/L, pH 5,5, contendo 80% de metanol B: tampão fosfato de sódio monoidratado 0,04 mol/L, pH 5,5, contendo 20% de metanol. O padrão do gradiente foi modificado de acordo com o tampão B na fase móvel: 90% a 0,00 min, 10% a 48 min, 100% a 55 min. A leitura foi realizada em detector de fluorescência (360nm/455nm). A quantidade de amostra foi 40µL e a concentração expressa em µM/ µg de proteína.

4.4.2 Quantificação de sinaptofisina e neurotrofinas

Uma alíquota do sinaptossoma foi armazenada a -20°C para análise do imunocconteúdo proteico de sinaptofisina, PSD95, Gefirina, NGFR e BDNF por Western blot, conforme a (Tabela 2). As amostras de isolado de sinaptossoma foram normalizadas por quantidade de proteína total e solubilizadas em 25% (v/v) de Laemmli (solução contendo 44,4% de glicerol, 277,8mM de Tris-HCl pH 6,8, SDS 4,4%, azul de bromofenol 0,02%) e 10% (v/v) de 2-mercapto-etanol. Concentrações iguais de proteína (30µg/poço ou 20ug/poço), foram aplicadas em gel de SDS poliacrilamida 10% e/ou 12% (PAGE) para eletroforese. Posteriormente, os géis foram

transferidos para membranas de nitrocelulose usando o equipamento Transblot SD – Semi Dry Electrophoretic Transfer Cell (Biorad) por 45min a 25V em tampão de transferência (Tris 48mM, glicina 39mM, metanol 20%, SDS 0,25%). A eficiência do eletroblotting foi verificada através da coloração de Ponceau S. As membranas foram lavadas até a retirada total do Ponceau S e mais três vezes de 5min com TTBS (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, contendo 0.9% NaCl, and 0.1% Tween-20) seguido por 1h de incubação em solução bloqueadora (TTBS com 5% de albumina bovina, fração V). Após a incubação, a membrana foi lavada três vezes por 5min com tampão TTBS e então incubada durante a noite a 4°C em solução contendo os anticorpos primários policlonais ou monoclonais: anti-NGFR (SIGMA N3908), anti-BDNF (ABCAM), anti-sinaptofisina (Cell Signaling 4329S), anti-PSD95 (Cell Signaling 36233), anti-Gefirina (ABCAM ab32206) e Anti- β -actin (SIGMA A1978) (Tabela 2). Em seguida, a membrana foi lavada três vezes por 5min com TTBS e incubada com anticorpo secundário anti-rabbit immunoglobulin G (IgG), conjugado com peroxidase (AP132P MERCK) ou anti-mouse IgG, conjugado com peroxidase (AP124P MERCK) por 1h á temperatura ambiente. Por fim, foi realizada mais três lavagens de 5min com TTBS. A imunoreatividade foi detectada por reação quimioluminescente com um kit comercial de substrato de peroxidase (kit Supersignal West Pico Chemiluminescent da Thermo Fisher Scientific®). A quimioluminescência foi capturada utilizando ImageQuantLAS 4000 (GE Healthcare). Análise densitometria das imagens foi realizada utilizando o software ImageJ (ImageJv1.49, Instituto Nacional de Saúde, EUA). Todos os resultados foram expressos como uma razão relativa para β -actina (MERCK A1978). Seis animais por grupo foram usado para análise estatística.⁷⁸

Tabela 2. Especificações dos anticorpos primários e secundários utilizados para Western Blot nas amostras de isolado de sinaptossoma, os mesmos anticorpos foram usados para todas as estruturas encefálicas analisadas no projeto.

Reagente	Meio de diluição	Diluição	Fornecedor	Catálogo #	Tempo
Anticorpos primários					
Anti-PSD95	TTBS	1:1000	CS	36233	Overnight à 4°C
Anti-Gephyrin	5% BSA-TTBS 0,1%	1:500	Abcam	ab32206	Overnight à 4°C
Anti-Synaptophysin	TTBS	1:2000	CS	4329S	Overnight à 4°C
Anti- BDNF	TTBS	1:1000	ThermoFischer	OSB00017W	Overnight à 4°C
Anti-NGFR	TTBS	1:5000	SIGMA	N3908	Overnight à 4°C
Anti- β -actina	TTBS	1:4000	SIGMA	A1978	3h à temperatura ambiente
Anticorpos secundários					
Reagente	Meio de diluição	Diluição	Fornecedor	Catálogo #	Tempo
Anti-Mouse	TTBS	1:2000	MERCK	AP124P	1h à temperatura ambiente
Anti-Rabbit	TTBS	1:2000	MERCK	AP132P	1h à temperatura ambiente

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

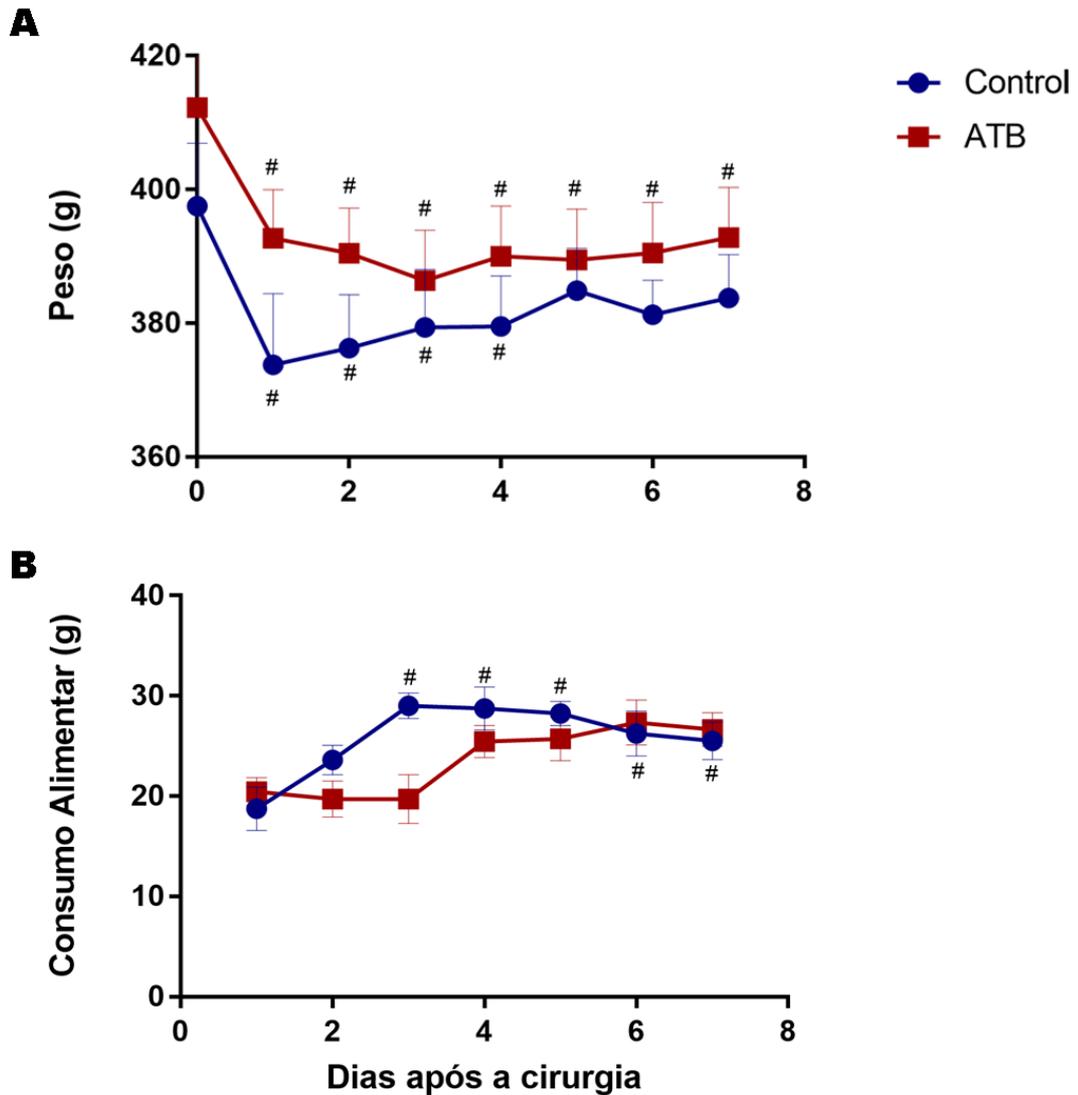
As análises de consumo alimentar e peso ao longo do tempo foram analisadas com o teste *Generalized Estimating Equation* (GEE) no software *Statistical Package for the Social Sciences* (IBM SPSS®). Para o restante das análises estatísticas foi utilizado o software *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA).

O teste *t student* (duas-caudas) foi aplicado para comparações simples entre o grupo controle e o grupo antibiótico (ATB) nos experimentos de *Western Blot*. O teste não-paramétrico *Mann-Whitney* foi utilizado para as análises de dados não-paramétricos e o teste *t Student*, para dados paramétricos, nos resultados do HPLC. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \geq 0.05$.

6 RESULTADOS

6.1 TRATAMENTO COM ATB AFETA O CONSUMO ALIMENTAR E A RECUPERACAO DE PESO NO PÓS-CIRURGICO

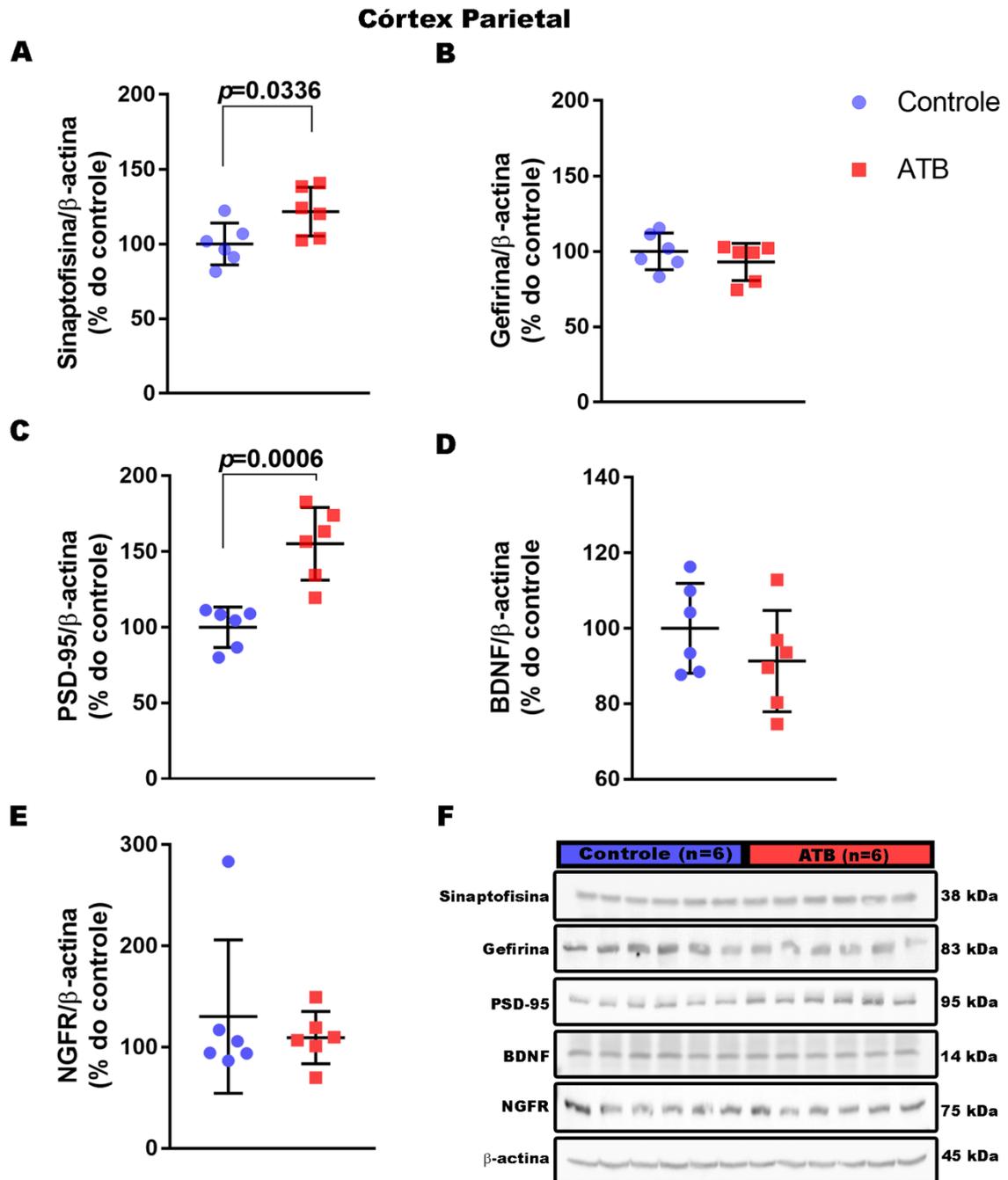
A análise revelou uma interação entre o procedimento cirúrgico e tratamento com ATBs ($p \geq 0.05$) no peso dos animais (Fig. 1A). O peso de todos os grupos experimentais diminuiu após o procedimento cirúrgico. Entretanto, se observa que a diferença de peso desaparece ao quarto dia pós-cirúrgico nos animais do grupo controle enquanto a diferença se mantém ao longo de todo o período experimental nos animais que receberam ATBs. Também se observou uma interação entre o procedimento cirúrgico e o tratamento com ATBs no consumo alimentar dos animais (Fig. 1B). É possível observar que o consumo alimentar diminuiu em todos os grupos experimentais após o procedimento cirúrgico. Entretanto, se observa que a diferença no consumo de alimento desaparece no terceiro dia pós-cirúrgico nos animais controle enquanto a diferença somente desaparece no sexto dia pós-cirúrgico nos animais que receberam o tratamento com ATBs.



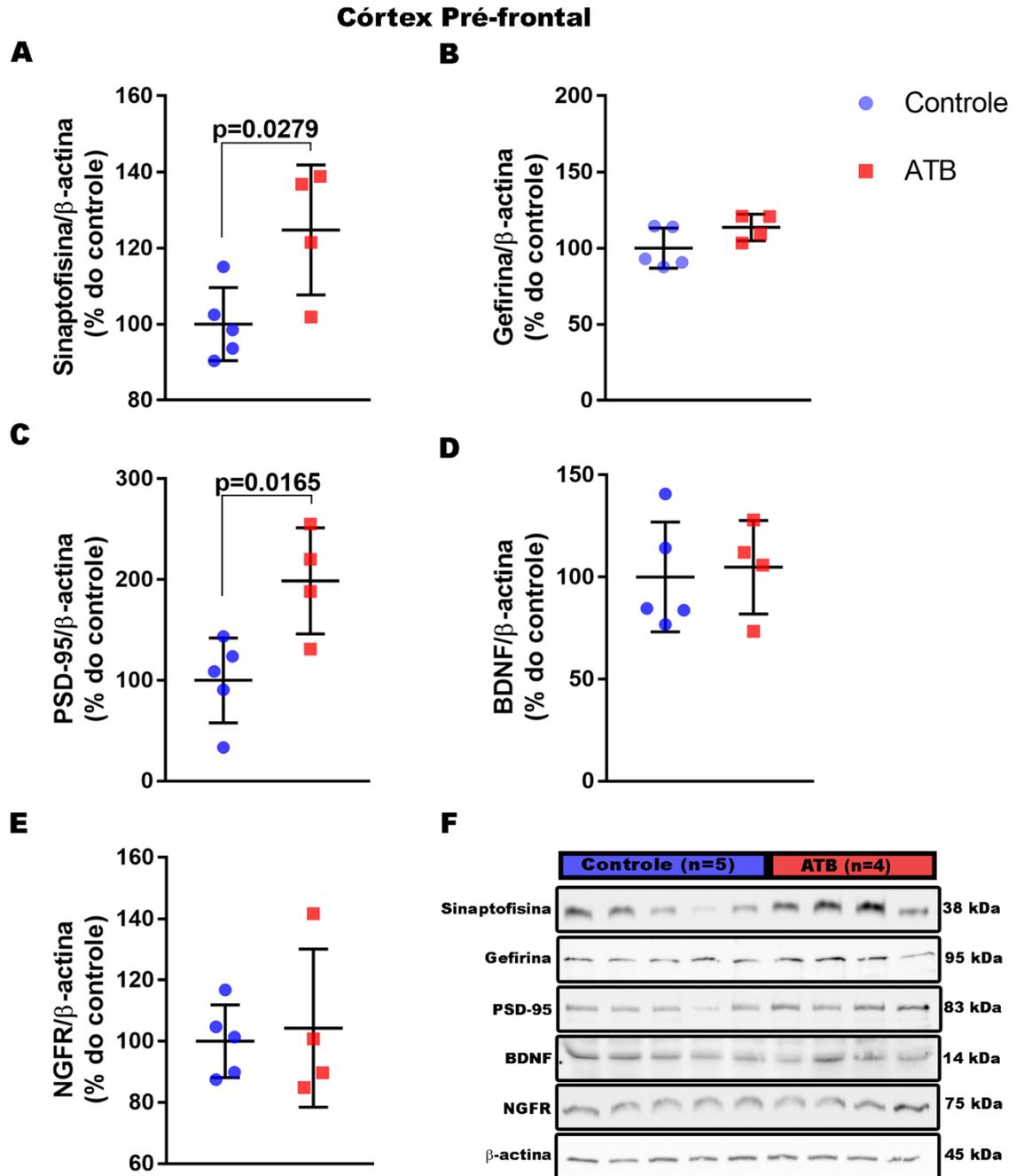
2 Fig. 1: Peso e consumo alimentar em ratos controle (n=10) e ratos tratados com ATBs (n=10) após a cirurgia de implantação de eletrodos. (A) Peso dos animais (g) (B) Consumo alimentar (g). Não se observou diferença entre grupos controle e tratados em nenhum dos parâmetros avaliados, mas se observa diferença significativa entre o mesmo grupo ao passar dos dias após a cirurgia e o início do tratamento com ATBs. Dados apresentados como média \pm EPM. # $p \geq 0.05$ quando diferente do dia 0 entre o mesmo grupo. De acordo com o teste GEE, feito no software SPSS.

6.2 TRATAMENTO COM ATB INDUZ UM AUMENTO DO IMUNOCONTEÚDO DE MARCADORES DE PLASTICIDADE SINÁPTICA EXCITATÓRIA NO CÓRTEX

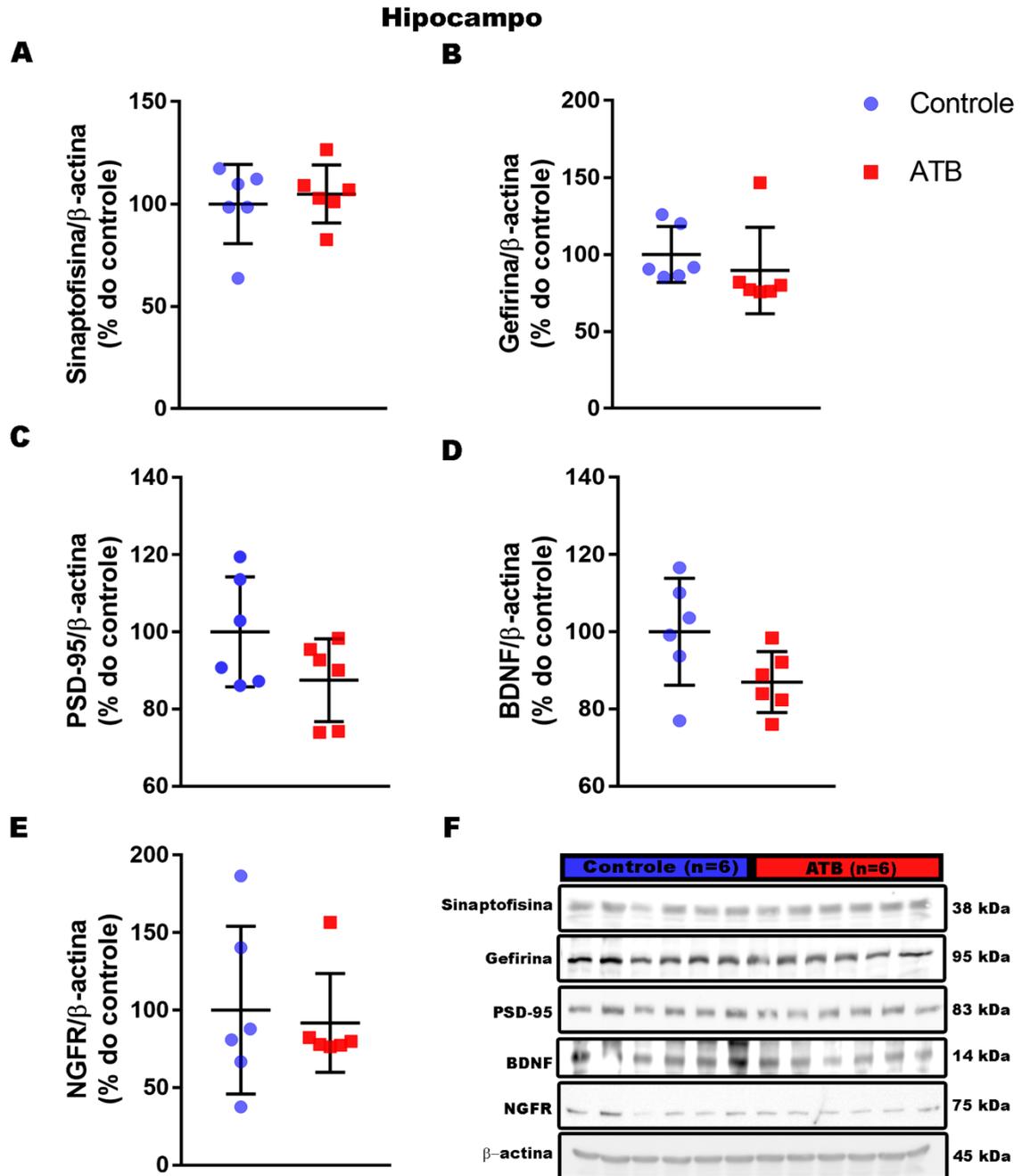
Os experimentos demonstraram uma alteração no conteúdo dos sinaptossomas extraídos das regiões do córtex parietal e córtex pré-frontal dos animais tratados com ATBs em comparação a grupo controle (Fig. 2A e 2C, 3A e 3C). Observamos uma diferença significativa na quantidade de sinaptofisina no grupo tratado (Fig. 2A, $p \geq 0,05$). O marcador PSD95 se mostra também alterado no córtex parietal (Fig. 2C, $p \geq 0,05$). Algo muito parecido observamos nas figuras referentes ao córtex pré-frontal (Fig. 3A e 3C), onde estes mesmos marcadores estão aumentados, no grupo tratado com ATBs em relação ao controle ($p \geq 0,05$). Os níveis de proteínas nos extratos do hipocampo não tiveram diferença entre os grupos experimentais (Fig. 4).



3 Fig. 2: Western Blot de isolado de sinaptossoma da região do córtex parietal de ratos Wistar após 7 dias de tratamento com ATBs. Os gráficos demonstram a quantificação dos géis para os anticorpos **(A)** sinaptofisina, **(B)** PSD95 **(C)** Gefirina **(D)** BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) e **(E)** NGFR (Nerve Growth Factor Receptor). **(F)** Imagens originais de *western blotting*. Dados apresentados como média \pm EPM n=6 ratos por grupo. De acordo com o Teste *t Student* $p \geq 0.05$, (duas-caldas), GraphPad Prism.



4 Fig. 3: Western Blot de isolado de sinaptossoma da região do córtex pré-frontal de ratos Wistar após 7 dias de tratamento com ATBs. Os gráficos demonstram a quantificação dos géis para os anticorpos **(A)** sinaptofisina, **(B)** PSD95 **(C)** Gefirina **(D)** BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) e **(E)** NGFR (Nerve Growth Factor Receptor). **(F)** Imagens originais de *western blotting*. Dados apresentados como média \pm EPM de $n=5$ para o grupo Controle e $n=4$ para o grupo ATB. De acordo com o Teste *t Student* $p \geq 0.05$, (duas-caldas), GraphPad Prism.

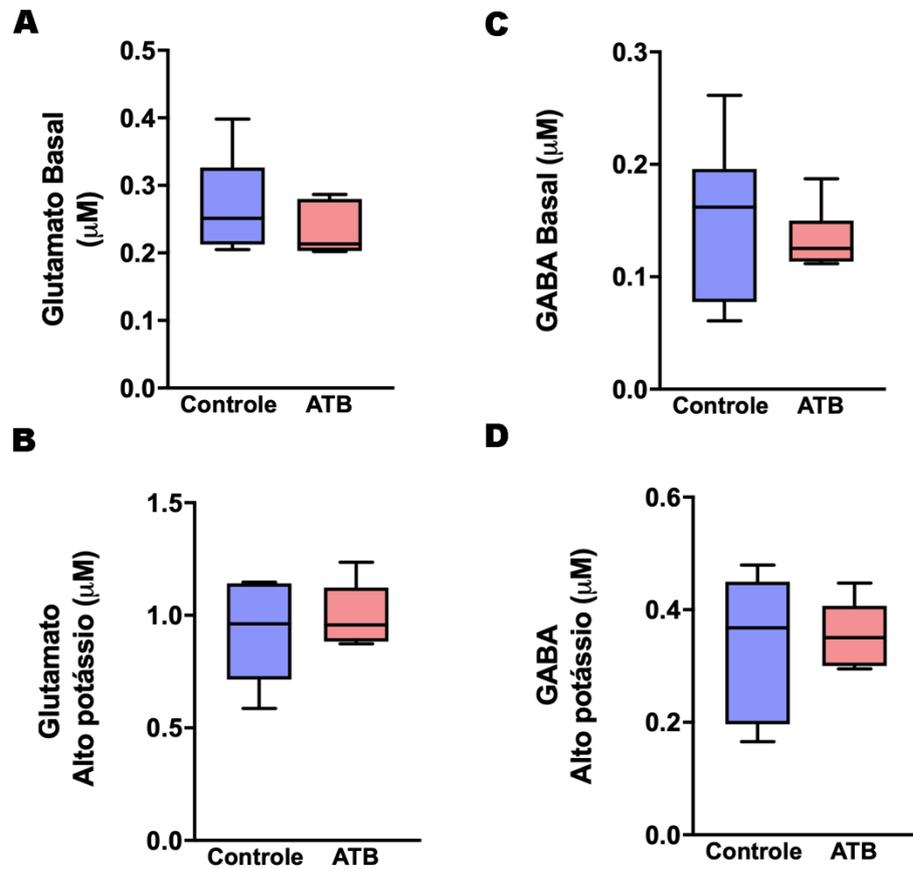


5 Fig. 4: Western Blot de isolado de sinaptossoma da região do hipocampo de ratos Wistar após 7 dias de tratamento com ATBs. Os gráficos demonstram a quantificação dos géis para os anticorpos **(A)** sinaptofisina, **(B)** PSD95 **(C)** Gefirina **(D)** BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) e **(E)** NGFR (Nerve Growth Factor Receptor). **(F)** Imagens originais de *western blotting*. Dados apresentados como média \pm EPM n=6 ratos por grupo. De acordo com o Teste *t Student* $p \geq 0.05$, (duas-caldas), GraphPad Prism.

6.3 TRATAMENTO COM ATB MODULA OS NEUROTRANSMISSORES NO ENCÉFALO

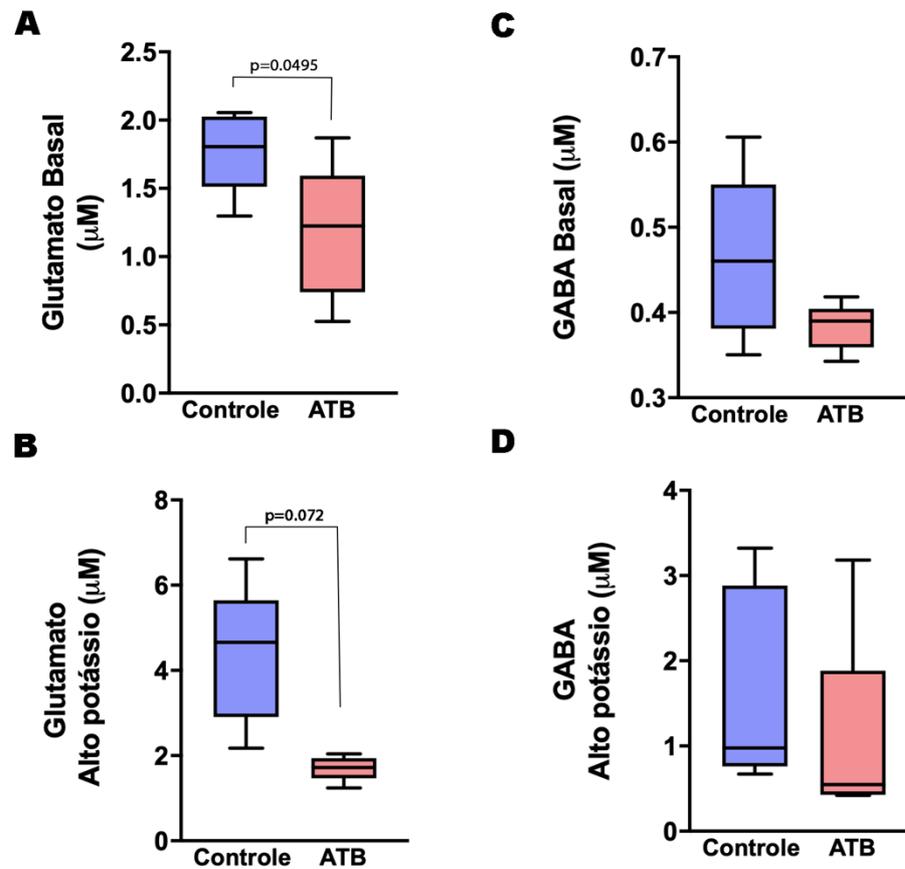
Para verificar se a alteração de neurotrofinas estava associada a alterações de neurotransmissores analisamos o extraído de sinaptossoma por HPLC. Os níveis de neurotransmissores nos extratos do córtex parietal e do hipocampo não tiveram diferença significativa entre os grupos experimentais (Fig. 5) e (Fig. 7), respectivamente. Já no que diz respeito ao córtex pré-frontal houve uma significativa diferença, diminuindo a quantidade de Glutamato, tanto na condição considerada basal quanto quando o sinaptossoma foi estimulado com alto potássio, simulando a liberação desse neurotransmissor ($p \geq 0,05$) (Fig.6).

CÓRTEX PARIETAL

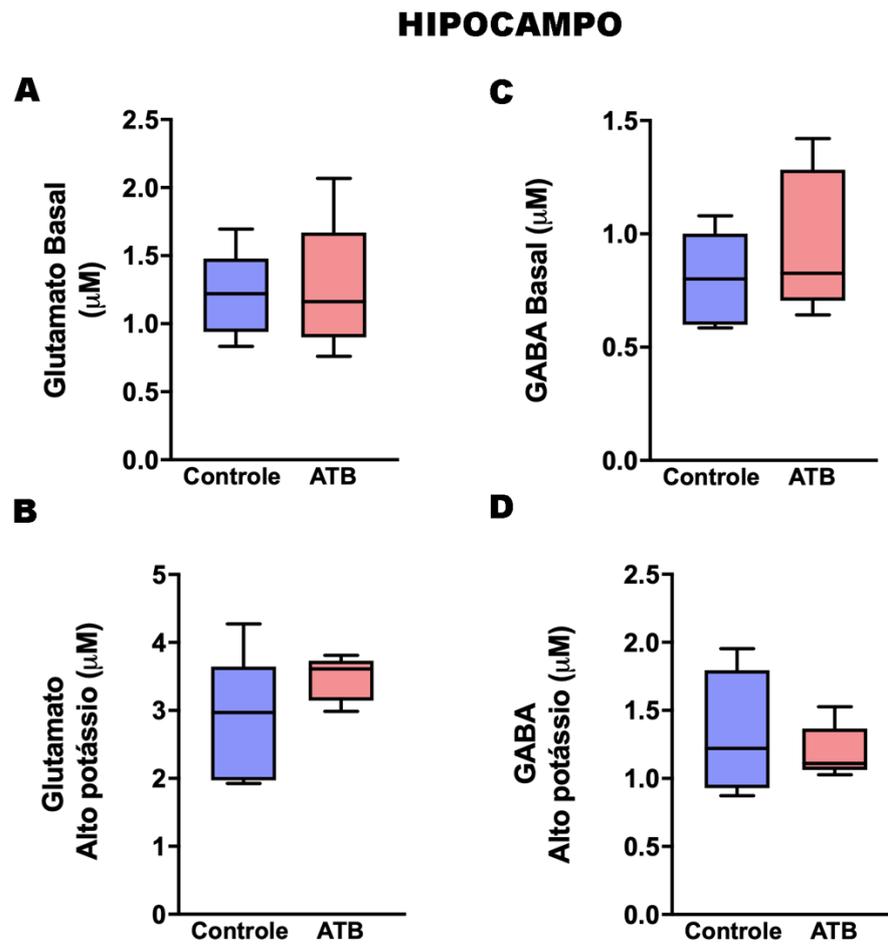


6 Fig. 5: Concentração de glutamato (GLU) e ácido gama-aminobutírico (GABA) em sinaptossomas do córtex parietal de ratos Wistar após 7 dias de tratamento com ATBs. Concentração GLU em sinaptossoma exposto ao meio com baixa (**A**) ou alta concentração de potássio (**B**) e concentração GABA em sinaptossoma exposto ao meio com baixa (**C**) ou alta concentração de potássio (**D**). Dados apresentados como média \pm EPM. Teste *Mann-Whitney*, $n=5$ ratos por grupo.

CÓRTEX PRÉ-FRONTAL



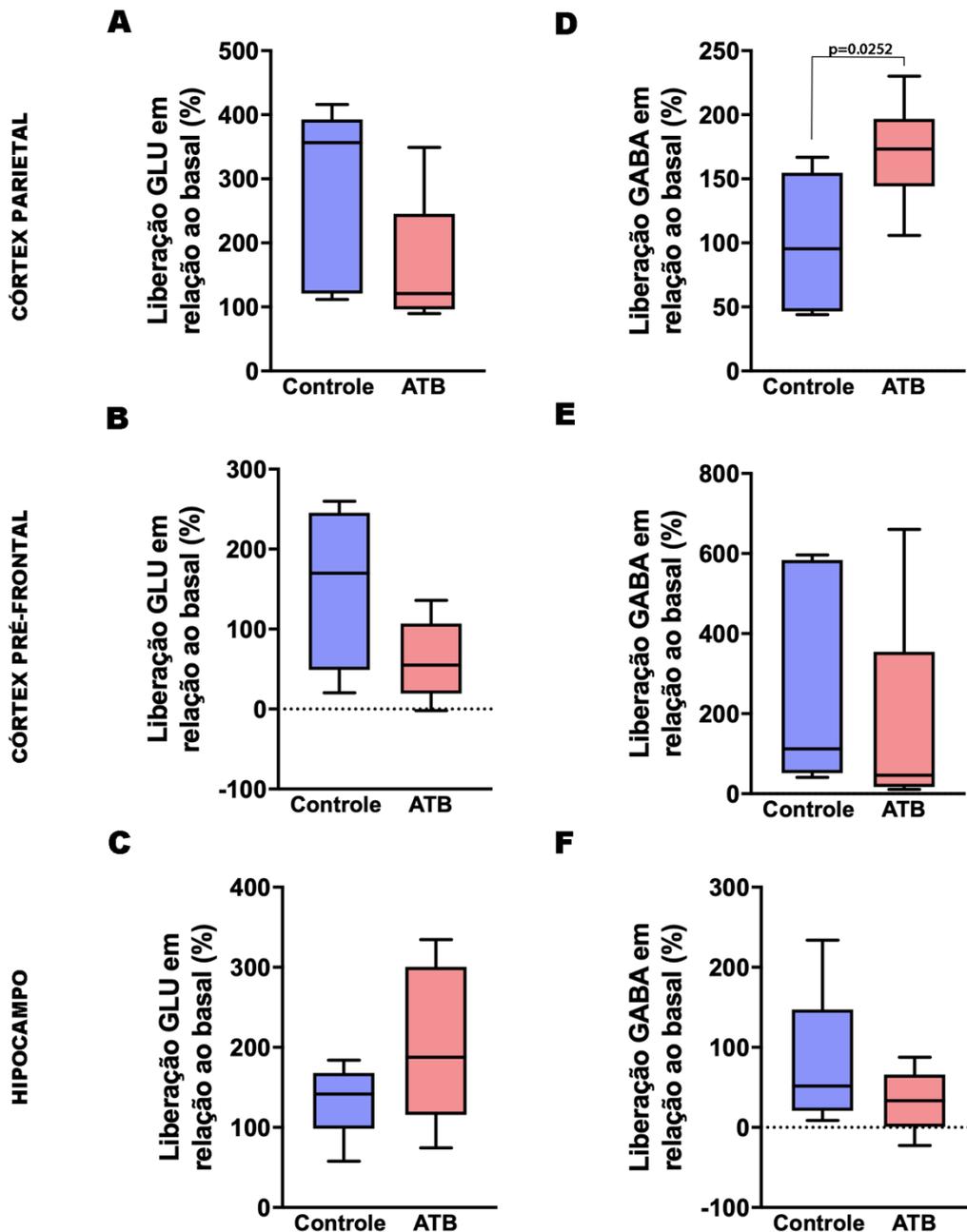
7 Fig. 6: Concentração de glutamato (GLU) e ácido gama-aminobutírico (GABA) em sinaptossomas do córtex pré-frontal de ratos Wistar após 7 dias de tratamento com ATBs. Concentração GLU em sinaptossoma exposto ao meio com baixa (A) ou alta concentração de potássio (B) e concentração GABA em sinaptossoma exposto ao meio com baixa (C) ou alta concentração de potássio (D). Dados apresentados como média \pm EPM. Teste *Mann-Whitney*, $n=5$ ratos por grupo.



8 Fig. 7: Concentração de glutamato (GLU) e ácido gama-aminobutírico (GABA) em sinaptossomas do hipocampo de ratos Wistar após 7 dias de tratamento com ATBs. Concentração GLU em sinaptossoma exposto ao meio com baixa (A) ou alta concentração de potássio (B) e concentração GABA em sinaptossoma exposto ao meio com baixa (C) ou alta concentração de potássio (D). Dados apresentados como média \pm EPM. Teste *Mann-Whitney*, $n=5$ ratos por grupo.

6.3.1 Tratamento com ATB induz alterações na liberação de gaba no córtex parietal

Para uma melhor visualização de possíveis alterações da liberação de neurotransmissores após despolarização com solução alto potássio, os dados foram analisados em porcentagem de liberação após exposição ao meio de alto potássio em relação ao basal. Neste parâmetro apenas houve diferença significativa na liberação de GABA no isolado de córtex parietal, havendo um aumento da liberação de GABA no grupo tratado em relação ao controle ($p \geq 0,05$) (Fig. 9D). O restante das estruturas do SNC não apresentou diferença significativa quando diz respeito a relação de liberação de neurotransmissores quando estimulados com alto potássio em relação ao basal (Fig 9A, 9B, 9C, 9E e 9F).



9 Fig. 8: Cálculo da liberação dos neurotransmissores, GABA e glutamato em relação ao basal no córtex pré-frontal, parietal e hipocampo. Os gráficos são feitos com os cálculos da porcentagem da liberação em relação ao basal usando as quantificações de Glutamato (GLU) e Ácido Gama-aminobutírico (GABA) por HPLC de isolado de sinaptossoma da região do córtex parietal (A) e (D), córtex pré-frontal (B) e (E) e hipocampo (C) e (F) de ratos Wistar após 7 dias de tratamento com ATBs.. Dados apresentados como média \pm EPM $n=5$ ratos por grupo. De acordo com o Teste *t Student* $p \geq 0.05$, (duas-caldas), ou Teste *Mann-Whitney* para resultados não paramétricos, GraphPad Prism.

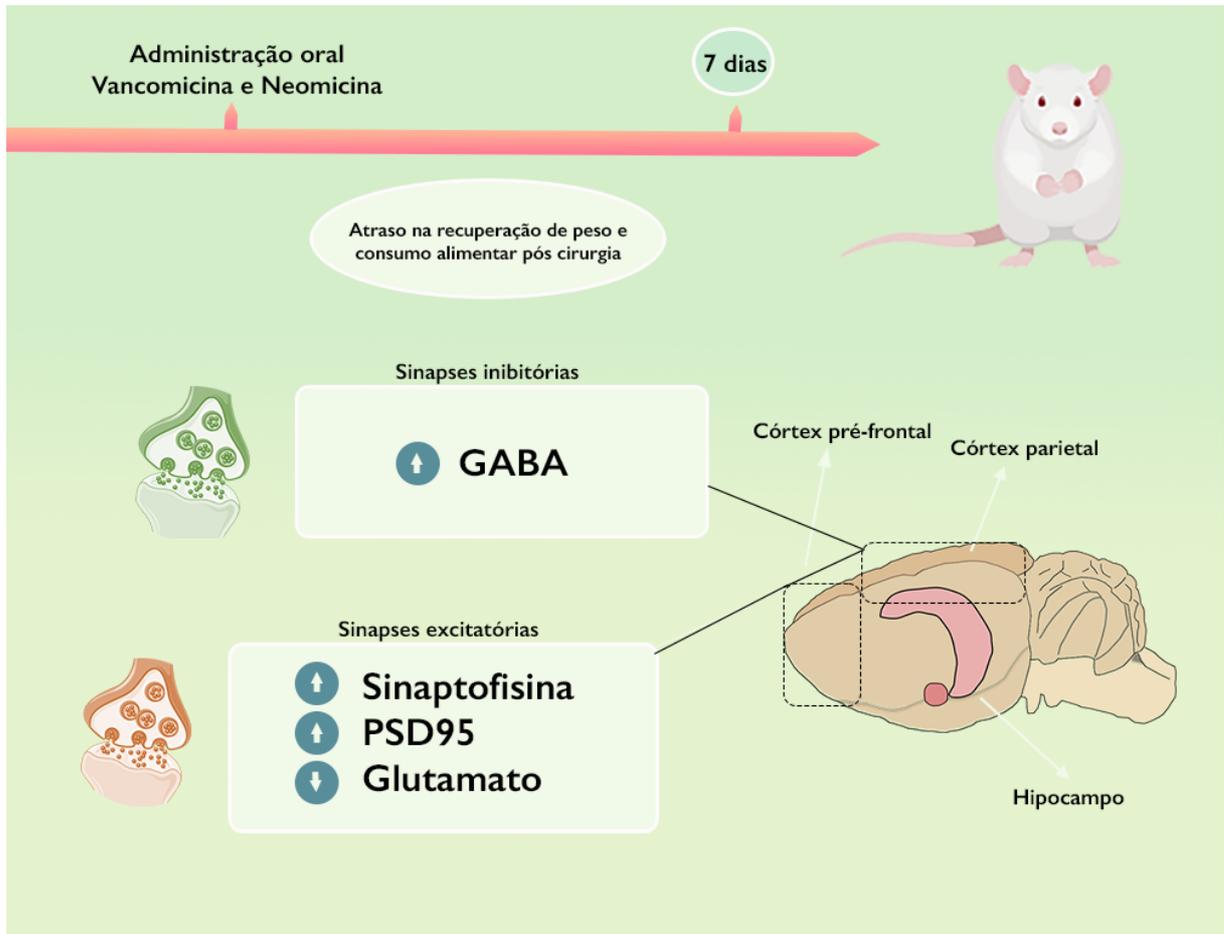


Figura 10: Resumo Ilustrativo dos Resultados.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o uso de ATB tem efeitos psicotrópicos no córtex parietal e pré-frontal, além de retardar o ganho de peso na recuperação pós cirurgia. Se pode observar que o tratamento aumentou os níveis de sinaptofisina e PSD95 no córtex, aumentou os níveis basais e induzidos do glutamato no córtex pré-frontal e aumentou a liberação de GABA no córtex parietal. Assim, foi possível confirmar a hipótese inicial testada de que o uso de ATBs resultaria a uma alteração da neuroquímica por meio do eixo de comunicação bidirecional microbiota-intestino-cérebro. As milhões de bactérias que vivem em nosso intestino já se mostraram essenciais para a saúde imune e metabólica do “super-organismo” que somos, e agora, cada vez mais se mostram importantes para a saúde do encéfalo. Os resultados encontrados neste trabalho estão alinhados com outros que observaram modificações no funcionamento do encéfalo após administração de antibióticos em modelos animais de experimentação, e vem corroborar para o maior entendimento desta relação complexa^{79,40,80,81}.

Em 2021, Wang *et al.*, utilizou um cocktail de antibióticos por 3 semanas em ratos *Sprague Dawley* e observou alterações na atividade neuronal em varias áreas do SNC, nos receptores de glicocorticoides e na concentração de serotonina. De modo similar Hoban *et al.*, em 2016, foi um dos primeiros a mostrar alterações comportamentais e neuroquímicas no encéfalo, incluindo alterações de BDNF e alterações nas citocinas^{80,82}. Ambos utilizaram cocktails de antibióticos, incluindo vancomicina isolada ou em combinação com neomicina (os mesmos utilizados no nosso estudo). Fröhlich *et al.*, também em 2016, observaram alterações neuroquímicas nos níveis de BDNF, neuropeptide Y, proteínas de junções

comunicantes e outros marcadores no hipocampo e na amígdala. Bercik *et al.*, em 2011, em análises de um modelo de administração de ATBs não absorvíveis semelhante ao usado neste trabalho, observou alterações de diminuição dos níveis de BDNF durante o tratamento. O possível motivo para os trabalhos citados acima terem observado uma alteração de BDNF após o uso de antibióticos diferente deste trabalho pode ser devido a forma de avaliação ter sido molecular e os estudos citados usarem modelo experimental em camundongos, enquanto fizemos uma análise proteica e em ratos.

As sinapses neuronais podem ser moduladas por diversos fatores, incluindo alterações nos níveis de fatores neurotróficos no encéfalo. Estes fatores neurotróficos são afetados pela composição da microbiota intestinal, como citado acima, e estes regulam a liberação de diversos neurotransmissores no encéfalo, como o GABA e o glutamato, sendo seus níveis da mesma forma regulados por eles^{83,84}. No presente trabalho não observamos alterações nos níveis de BDNF, nem do receptor de NGF, podendo indicar um outro meio de modulação da mudança de liberação de neurotransmissores no córtex pré-frontal (Figura 6A e 6B).

Os neurônios das regiões do córtex parietal e pré-frontal demonstraram aumento na conectividade através do incremento dos níveis de sinaptofisina, um marcador de sinapses. Esse aumento foi majoritariamente de sinapses excitatórias indicado pela quantificação do PSD95 nas mesmas amostras. PSD95 possui um papel fundamental na maturação sináptica, ancorando e agrupando receptores AMPA e NMDA, na morfogênese dos espinhos dendríticos, e sua alteração pode estar impactando a transmissão glutamatérgica. Esse desequilíbrio excitatório/inibitório com alteração do marcador PSD95 já foi observado por inúmeros trabalhos relacionados com déficits em aprendizado e memória e doenças do neuro desenvolvimento, como

Autismo e Esquizofrênia, tendo a elevação de PSD95 mais relacionada com o primeiro, enquanto a sua baixa expressão com o segundo, respectivamente⁸⁵. Como exemplo, Kim *et al.*, observaram um aumento de sinaptofisina e PSD95 similar a este trabalho, em animais submetidos ao modelo de autismo induzido por ácido valpróico e com prejuízos no comportamento social⁸⁶.

O transtorno do espectro autista (TEA) tem sido associada com mudanças na microbiota intestinal em diversos contextos. Os pacientes com essa desordem apresentam perfil microbiano diferente de indivíduos saudáveis e diversas comorbidades gastrointestinais. Além disso, diversos estudos investigam o uso de antibióticos na gestação e infância como fator de risco para o desenvolvimento de comportamentos do TEA, ensaios clínicos já foram relatados com modelos terapêuticos baseados em modulação da microbiota intestinal por antibióticos, e transplante de microbiota^{37,87,88,89}. Em 2018 Bittker & Bell analisaram cinco variáveis pós-natais com relação ao TEA, e a exposição a ATBs se mostrou associada como fator de risco⁹⁰. Outro estudo de 2017 de Kohler *et al.* observou que o risco para transtornos mentais graves era maior em humanos adultos com infecções tratadas com antibióticos de moderado e amplo espectro⁹¹. Mais uma vez, hipoteticamente isso poderia ocorrer pela modificação dos metabólitos produzidos pela microbiota que modificaria a função cerebral e o comportamento através do eixo-microbiota-intestino cérebro discutido anteriormente⁹².

De modo similar a PSD95, a gefirina atua como uma proteína ligada ao citoesqueleto que ancora os receptores de GABA e glicina nas sinapses inibitórias na membrana pós-sináptica. As modificações nesta proteína impactam a formação e a plasticidade das sinapses GABAérgicas. Ela também tem a importante função de atuar como um centro de sinalização, mantendo o equilíbrio inibitório/excitatório,

através do ajuste da força de transmissão de GABA a partir da atividade sináptica excitatória e vários sinais extracelulares⁶⁷. A ocorrência simultânea de potencial pós-sináptico inibitório reduz a probabilidade de LTP nos neurônios. Há evidências também de que bloquear os receptores de GABA no hipocampo piora a memória espacial de trabalho. Entretanto, neste trabalho não observamos alteração nos níveis de gefirina, o que poderia indicar aumento/diminuição ou modificações nas sinapses inibitórias. Por outro lado, o tratamento modificou a liberação do neurotransmissor GABA no córtex parietal, indicando que o tratamento não teve impacto na formação de novas sinapses inibitórias, mas pode ter influenciado outros aspectos como a o armazenamento, síntese e/ou receptação do neurotransmissor. Dessa forma, mais estudos se tornam necessários para entender os efeitos da perturbação da microbiota por ATBs na transmissão inibitória.

As mudanças comportamentais observadas em diversos trabalhos, nos quais perturbações na microbiota levam a um aumento no comportamento ansioso, tipo depressivo e relacionado ao estresse em ratos, demonstra a importância de mais estudos para entender se a microbiota pode ajudar a melhorar a saúde mental. Para isso é necessário melhor compreender como a microbiota modula o sistema de transmissão entre os neurônios do encéfalo é necessário, e o estudo de neurotransmissores é o dos pensamentos mais óbvios para avaliar essa influência.

Tem sido observado que as bactérias consomem ou produzem muitas moléculas que tem função de neurotransmissores. Já foi visto que elas produzem diretamente neurotransmissores como dopamina, norepinefrina, serotonina e GABA, e interferem indiretamente na produção de serotonina pelo hospedeiro. Muitas cepas bacterianas produzem glutamato, como por exemplo *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus lactis* e *Coryneform*. Outros trabalhos também já demonstraram que o

glutamato metabolizado pela microbiota pode ser associado com obesidade, crises epiléticas, Alzheimer, TEA e cognição⁹³. Em 2019, Wang *et al.* analisaram amostras fecais de 43 crianças com TEA e observaram um aumento na abundância da microbiota associada com o metabolismo do glutamato⁹⁴. Olson *et al.* em 2018, publicaram que a modulação da microbiota estava por trás da melhora de crises epiléticas em camundongos submetidos a uma dieta cetogênica. A dieta alterou a microbiota, e esta modulou o hipocampo para um perfil metabólico protetor de crises, aumentando os níveis de GABA e reduzindo os de glutamato, equilibrando o desbalanço excitatório/inibitório, neste mesmo estudo se observou que animais germ-free ou tratados com ATBs não se beneficiavam da mesma maneira da dieta⁹⁵. Outro estudo com humanos demonstrou que a microbiota intestinal está associada a rapidez e flexibilidade mental relacionado aos níveis de glutamato séricos e fecais⁹⁶. De maneira interessante, no nosso estudo também observamos mudanças nos níveis de glutamato, tanto em condições basais quanto estimulado com meio com alto potássio, nos sinaptossomas isolados do córtex pré-frontal analisados por HPLC (Figura 6A, 6C). Em resumo, observamos uma diminuição significativa no grupo ATB em relação ao controle. Portanto, podemos dizer que a perturbação na microbiota gerada pelo uso de ATBs resultou em impacto considerável no equilíbrio excitatório/inibitório quando comparado ao controle. Os níveis de glutamato se alteraram, diminuindo nas análises basais e quando estimulado no isolado de sinaptossoma, porém a proporção da quantidade liberada não se alterou (Figura 8B).

Em relação ao GABA, observamos um aumento na porcentagem de liberação em relação ao basal no córtex parietal (Figura 8D). O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC e seus receptores estão amplamente distribuídos nos mamíferos. Há muitas associações de alterações na transmissão de GABA e

doenças do SNC e do SNE, já que ele tem um papel conhecido na motilidade intestinal⁹⁷. Além disso, uma variedade de bactérias produz GABA no lúmen intestinal, incluindo muitas do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Adicionalmente, em animais *Germ free* já se observou níveis séricos e no lúmen diminuídos de GABA⁹⁸. Também Bravo *et al.*, em 2011, demonstraram que a administração de uma cepa de *Lactobacillus* alterou, aumentando a expressão de receptores de GABA em regiões corticais e diminuiu o comportamento tipo depressivo⁹⁹. Entretanto, não é do nosso conhecimento outro estudo que tenha demonstrado alterações no GABA no SNC após o uso de ATBs. No nosso trabalho, com o uso de ATBs também observamos diferença na porcentagem de liberação de GABA em relação ao basal, corroborando para demonstrar que as modificações na microbiota intestinal podem afetar os níveis centrais de GABA. Esta alteração na liberação de GABA pode estar associada a mudanças na síntese, no armazenamento das vesículas deste neurotransmissor e/ou na sua recaptação.

Apesar do aumento de PSD95, não se pode observar alterações na liberação de glutamato. Uma possibilidade poderia ser um aumento de outros neurotransmissores excitatórios não analisados neste trabalho. Hoban *et al.*, em análises por HPLC após indução da depleção da microbiota com antibióticos, encontraram diminuição dos níveis de precursores da dopamina e seu metabólito (L-DOPA) no córtex pré-frontal e no hipocampo e diminuição dos níveis de serotonina no hipocampo. Heijtz *et al.* também demonstrou através de análises de metabólitos, que o *turnover* de neurotransmissores como a dopamina, serotonina e noradrenalina aumentaram no estriado de camundongos, porém não observaram diferença no hipocampo e no córtex pré-frontal. Diferentemente, Crumeyrolle *et al.*, em 2014 observou que o *turnover* dopaminérgico no estriado, hipocampo e córtex frontal

diminuiu em animais *germ-free*¹⁰⁰. Com isso, mais estudos são necessários para o entendimento de como a microbiota afeta a neurotransmissão.

Das três estruturas encefálicas isoladas do encéfalo e utilizadas no trabalho, o hipocampo foi a única que não se alterou em nenhum aspecto nas análises feitas após a modulação da microbiota utilizando antibióticos. Heijtz *et al.*, em 2011 encontraram uma situação parecida em camundongos *Germ-free*, na qual os níveis de sinaptofisina e PSD95 se alteraram no estriado, porém não se modificou no hipocampo¹⁰¹. Arentsen *et al.*, 2015, investigou a expressão de BDNF e observou que entre as nove variantes de *splicing* da proteína, apenas quatro apresentaram diminuição em camundongos *Germ-free*, indicando ainda mais a importância de análises moleculares de RNAm (Ácido ribonucleico - RNA mensageiro) para avaliar com mais precisão mudanças nesta neurotrofina.

É importante acrescentar que os mecanismos pelos quais a microbiota afeta o SNC ainda não estão completamente elucidados, mas muitos trabalhos já demonstram que ela pode utilizar mais de um meio para exercer essa influência, como modular o sistema imune, mudanças no metabolismo ou por sinalização endócrina, atuando de forma sistêmica ou por alteração local do intestino, alterando sua permeabilidade ou mandando sinais via nervo vago até o encéfalo¹⁰².

Dentro deste contexto, é interessante mencionar que, já se sabe que existem bactérias capazes de produzir neurotoxinas que afetam especificamente um grupo de proteínas que permitem que as vesículas sinápticas se encaixem e se fundam com as membranas plasmáticas pré-sinápticas, como as bactérias *Clostridium botulinum*, e *Clostridium tetani*. Essa especificidade poderia explicar porque não se observou alterações no hipocampo. Fachi *et al.* em 2019, relataram que a microbiota exerce um

mecanismo de proteção contra a infecção por *Clostridium difficile*, e o uso de antibióticos faz com que se desencadeie a infecção. O antibiótico causa uma redução na resistência e proteção que a microbiota exerce, a bactéria ganha espaço competitivo produzindo toxinas que atacam o intestino, e causando a baixa na produção de SCFA, que protegeria o corpo das ações do patógeno. Os camundongos submetidos a dietas ricas em fibras apresentaram resistência a ação da bactéria¹⁰³. Similar nesse projeto, poderia outras bactérias patogênicas se beneficiar do uso de antibióticos e conseguirem exercer mais influência sobre o encéfalo através de neurotoxinas?

Para isso, seria de grande valia as análises metagenômicas da microbiota dos ratos tratados com ATBs para avaliar de forma mais detalhada as alterações que o antibiótico foi capaz de induzir no ecossistema intestinal. O presente estudo não fez essas análises não podendo discutir quais unidades taxonômicas específicas podem ter aumentado sua abundância/riqueza ou diminuído para causar os resultados observados. Da mesma forma, visto que as alterações encefálicas já foram observadas tanto com pontos de regulação a nível molecular e proteômico, e que não observamos alterações na neurotrofina BDNF, também seria de interesse fazer análises de RNAm junto as proteicas dos marcadores utilizados, para as mesmas amostras, podendo assim melhor avaliar as alterações provocadas pela disbiose. Contando esses parâmetros como limitações e também perspectivas do presente estudo.

Por outro lado, este estudo contribui para um tema já relativamente novo e com um grande potencial para a saúde humana. Neste estudo também utilizamos um modelo experimental baseado na perturbação da microbiota pelo uso dos ATBs não absorvíveis nos permitindo induzir uma disbiose e estudar as alterações no encéfalo

de forma independente de alterações sistêmicas que poderiam ser induzidas por outros antibióticos. Adicionalmente, se usou animais com uma grande variabilidade genética que reflete mais as condições não controladas da realidade clínica.

Por fim, os antibióticos têm sido usados para esclarecer a influência da microbiota intestinal na neuroquímica e comportamento do encéfalo. O uso destes ATBs nos permite estudar a influência da microbiota no encéfalo, com uma abordagem próxima da realidade clínica, utilizando uma estratégia viável do ponto de vista financeiro e estrutural. Entender a microbiota e sua implicação no estado de saúde e doença no corpo humano, abre uma gama enorme de possibilidades para uma medicina mais integrada considerando a complexidade que é o organismo humano.

8 CONCLUSÕES

Nosso trabalho demonstrou, corroborando com outros trabalhos na literatura, evidências que os antibióticos podem, possivelmente através de uma perturbação da microbiota influenciar e ter um papel no funcionamento do SNC adulto. Os resultados corroboram que a plasticidade cerebral e a modulação dos neurotransmissores é afetada pela modulação da microbiota. Entretanto, ainda são necessários mais estudos para entender como a microbiota promove essas alterações e se isso pode e como ser aplicada no campo terapêutico.

9 PERSPECTIVAS

O presente estudo abre as seguintes perspectivas:

- Uma vez que observamos mudanças sinápticas, se torna interessante a análise do ECoG destes animais, uma abordagem ainda pouco explorada na literatura que pode ser importante para ajudar a determinar a natureza do sinal periférico atuando no encéfalo, visto que os registros do eletrocorticograma são uma observação indireta das sinapses neuronais.

- Uma vez que observamos alterações na plasticidade sináptica, estudos comportamentais poderiam ser de grande ajuda para compreender se estas alterações têm impacto no comportamento, como por exemplo no comportamento tipo ansioso ou depressivo, no aprendizado e memória dos animais.

- Também, como observamos mudanças nos níveis dos neurotransmissores glutamato e GABA, poderíamos analisar do ponto de vista eletrofisiológico as mudanças na transmissão sináptica inibitória e excitatória através da análise detalhada das correntes inibitórias pós-sinápticas (CIPS) e das correntes excitatórias pós-sinápticas (CEPS) espontâneas e evocadas através de registros de *patch-clamp in vitro* (*voltage-clamp*) em neurônios corticais.

- Já que o presente estudo analisa os efeitos do uso de ATBs a curto prazo, fazer análises de longo prazo a fim de verificar se estas mudanças persistem.

- Tendo em vista que o presente estudo usou apenas ratos machos, é interessante a investigação de alterações sexo dependentes, repetindo o estudo com ratos *Wistar* fêmeas.

10 APOIO FINANCEIRO

Este estudo foi desenvolvido pelo aporte financeiro fornecido pelo CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, FAPERGS – Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul, CAPES e PROPESq – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação UFRGS, assim como a mestranda recebeu auxílio CNPq para realizar este projeto.

REFERÊNCIAS

1. Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* (2016) doi:10.1016/j.cell.2016.01.013.
2. Gilbert, J. A. *et al.* Current understanding of the human microbiome. *Nat. Med.* **24**, (2018).
3. Kinross, J. M., Darzi, A. W. & Nicholson, J. K. Gut microbiome-host interactions in health and disease. *Genome Med.* **3**, 14 (2011).
4. Parfrey, L. W. & Knight, R. Spatial and temporal variability of the human microbiota. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, 5–7 (2012).
5. Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P. & Bäckhed, F. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell* vol. 165 1332–1345 (2016).
6. Lyte, M. Microbial Endocrinology in the Microbiome-Gut-Brain Axis: How Bacterial Production and Utilization of Neurochemicals Influence Behavior. *PLoS Pathog.* **9**, 9–11 (2013).
7. Sampson, T. R. & Mazmanian, S. K. Control of brain development, function, and behavior by the microbiome. *Cell Host and Microbe* (2015) doi:10.1016/j.chom.2015.04.011.
8. Sudo, N. *et al.* Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic–pituitary–adrenal system for stress response in mice. *J. Physiol.* **558**, 263–275 (2004).
9. Desbonnet, L. *et al.* Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour. *Brain. Behav. Immun.* **48**, 165–173 (2015).
10. O’toole, P. W., Moya, A., Cantó, R. & Raoult, D. Changes in the intestinal microbiota from adulthood through to old age. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, 44–46 (2012).
11. Group, N. H. W. The NIH Human Microbiome Project. doi:10.1101/gr.096651.109.
12. Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K. & Knight, R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* (2012) doi:10.1038/nature11550.
13. Nyangahu, D. D. & Jaspan, H. B. Influence of maternal microbiota during pregnancy on infant immunity. *Clinical and Experimental Immunology* vol. 198 (2019).
14. Funkhouser, L. J. & Bordenstein, S. R. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLoS Biol.* **11**, e1001631 (2013).
15. Albenberg, L. G. & Wu, G. D. Diet and the Intestinal Microbiome: Associations, Functions, and Implications for Health and Disease. *Gastroenterology* **146**, 1564–1572 (2014).
16. Manco, M., Putignani, L. & Bottazzo, G. F. Gut Microbiota, Lipopolysaccharides, and Innate Immunity in the Pathogenesis of Obesity and Cardiovascular Risk. *Endocr. Rev.* **31**, 817–844 (2010).
17. Corrêa-Oliveira, R., Fachi, J. L., Vieira, A., Sato, F. T. & Vinolo, M. A. R. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clinical and Translational Immunology* vol. 5 e73 (2016).
18. Hong, Y. H. *et al.* Acetate and propionate short chain fatty acids stimulate adipogenesis via

GPCR43. *Endocrinology* **146**, 5092–5099 (2005).

19. Lin, H. V. *et al.* Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PLoS One* (2012) doi:10.1371/journal.pone.0035240.
20. Unger, M. M. *et al.* Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls. *Park. Relat. Disord.* **32**, 66–72 (2016).
21. de la Cuesta-Zuluaga, J. *et al.* Higher fecal short-chain fatty acid levels are associated with gut microbiome dysbiosis, obesity, hypertension and cardiometabolic disease risk factors. *Nutrients* **11**, (2019).
22. Sivaprakasam, S., Prasad, P. D. & Singh, N. Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis. *Pharmacology and Therapeutics* vol. 164 144–151 (2016).
23. De Vadder, F. *et al.* Microbiota-Generated Metabolites Promote Metabolic Benefits via Gut-Brain Neural Circuits. *Cell* **156**, 84–96 (2014).
24. Morrison, D. J. & Preston, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* **7**, 189–200 (2016).
25. Fellows, R. *et al.* Microbiota derived short chain fatty acids promote histone crotonylation in the colon through histone deacetylases. *Nat. Commun.* **9**, 1–15 (2018).
26. Guerreiro, C. S., Calado, Â., Sousa, J. & Fonseca, J. E. Diet, Microbiota, and Gut Permeability—The Unknown Triad in Rheumatoid Arthritis. *Front. Med.* **5**, 349 (2018).
27. Caplan*, M. S. *et al.* Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology* **117**, 577–583 (1999).
28. Wang, Z. *et al.* The Role of Bifidobacteria in Gut Barrier Function After Thermal Injury in Rats. *J. Trauma Inj. Infect. Crit. Care* **61**, 650–657 (2006).
29. Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K. & Knight, R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **489**, 220–30 (2012).
30. De Vadder, F. *et al.* Microbiota-Produced Succinate Improves Glucose Homeostasis via Intestinal Gluconeogenesis. *Cell Metab.* **24**, 151–157 (2016).
31. Kovatcheva-Datchary, P. *et al.* Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. *Cell Metab.* (2015) doi:10.1016/j.cmet.2015.10.001.
32. Sun, J. *et al.* Anti-inflammatory properties and gut microbiota modulation of an alkali-soluble polysaccharide from purple sweet potato in DSS-induced colitis mice. *Int. J. Biol. Macromol.* **153**, 708–722 (2020).
33. Laphorne, S. *et al.* Gut microbial diversity is reduced and is associated with colonic inflammation in a piglet model of short bowel syndrome. *Gut Microbes* **4**, (2013).
34. Magro, D. O. *et al.* Remission in Crohn's disease is accompanied by alterations in the gut microbiota and mucins production. *Sci. Rep.* **9**, 13263 (2019).
35. Li, W. *et al.* Structural changes of gut microbiota in Parkinson's disease and its correlation with

- clinical features. *Sci. China Life Sci.* **60**, 1223–1233 (2017).
36. Ho, L. *et al.* Protective roles of intestinal microbiota derived short chain fatty acids in Alzheimer's disease-type beta-amyloid neuropathological mechanisms. *Expert Rev. Neurother.* **18**, 83–90 (2018).
 37. Kang, D. W. *et al.* Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Sci. Rep.* **9**, 1–9 (2019).
 38. Buffington, S. A. *et al.* Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. *Cell* **165**, 1762–1775 (2016).
 39. Russell, S. L. *et al.* Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma. *EMBO Rep.* **13**, 440 LP – 447 (2012).
 40. Bercik, P. *et al.* The Intestinal Microbiota Affect Central Levels of Brain-Derived Neurotropic Factor and Behavior in Mice. *Gastroenterology* **141**, 599-609.e3 (2017).
 41. Jang, H.-M., Lee, H.-J., Jang, S.-E., Han, M. J. & Kim, D.-H. Evidence for interplay among antibacterial-induced gut microbiota disturbance, neuro-inflammation, and anxiety in mice. *Mucosal Immunol.* (2018) doi:10.1038/s41385-018-0042-3.
 42. Ingram, J. L., Peckham, S. M., Tisdale, B. & Rodier, P. M. Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. *Neurotoxicol. Teratol.* **22**, 319–324 (2000).
 43. De Filippo, C. *et al.* Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 14691–14696 (2010).
 44. Bäckhed, F. *et al.* Defining a Healthy Human Gut Microbiome: Current Concepts, Future Directions, and Clinical Applications. *Cell Host Microbe* **12**, 611–622 (2012).
 45. Costa, M. & Weese, J. S. Methods and basic concepts for microbiota assessment. *Vet. J.* **249**, 10–15 (2019).
 46. Sherwin, E., Sandhu, K. V., Dinan, T. G. & Cryan, J. F. May the Force Be With You: The Light and Dark Sides of the Microbiota–Gut–Brain Axis in Neuropsychiatry. *CNS Drugs* **30**, (2016).
 47. Holzer, P. & Farzi, A. Neuropeptides and the microbiota- Gut-brain axis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **817**, (2014).
 48. Ogbonnaya, E. S. *et al.* Adult Hippocampal Neurogenesis Is Regulated by the Microbiome. *Biological Psychiatry* vol. 78 (2015).
 49. Fung, T. C., Olson, C. A. & Hsiao, E. Y. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nature Neuroscience* (2017) doi:10.1038/nn.4476.
 50. Lyte, M., Molina, F., Gewirtz, A., Acosta-Martinez, V. & Lyte, M. Microbial Endocrinology in the Microbiome–Gut–Brain Axis: How Bacterial Production and Utilization of Neurochemicals Influence Behavior. *PLoS Pathog.* **9**, e1003726 (2013).
 51. Adams, J. B., Johansen, L. J., Powell, L. D., Quig, D. & Rubin, R. a. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism--comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterol.* **11**, 22 (2011).

52. Lyte, M. Microbial endocrinology: Host-microbiota neuroendocrine interactions influencing brain and behavior. *Gut Microbes* **5**, 381–389 (2014).
53. Fülling, C., Dinan, T. G. & Cryan, J. F. Gut Microbe to Brain Signaling: What Happens in Vagus.... *Neuron* vol. 101 998–1002 (2019).
54. Dinan, T. G. & Cryan, J. F. The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. *Gastroenterology Clinics of North America* vol. 46 77–89 (2017).
55. Lundberg, R., Toft, M. F., August, B., Hansen, A. K. & Hansen, C. H. F. Antibiotic-treated versus germ-free rodents for microbiota transplantation studies. *Gut Microbes* **7**, 68–74 (2016).
56. Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T., Siegelbaum, S. & Hudspeth, A. J. *Princípios de neurociências-5*. (AMGH Editora, 2014).
57. Citri, A. & Malenka, R. C. Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* vol. 33 (2008).
58. Malenka, R. C. Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell* vol. 78 (1994).
59. Castillo, P. E., Chiu, C. Q. & Carroll, R. C. Long-term plasticity at inhibitory synapses. *Current Opinion in Neurobiology* vol. 21 (2011).
60. Tanapat, P., Galea, L. A. m. & Gould, E. Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. *Int. J. Dev. Neurosci.* **16**, (1998).
61. Ekdahl, C. T., Claassen, J. H., Bonde, S., Kokaia, Z. & Lindvall, O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, (2003).
62. Leung, K. & Thuret, S. Gut Microbiota: A Modulator of Brain Plasticity and Cognitive Function in Ageing. *Healthcare* **3**, (2015).
63. Fröhlich, E. E. *et al.* Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota-brain communication. *Brain. Behav. Immun.* (2016) doi:10.1016/j.bbi.2016.02.020.
64. Darch, H. T., Collins, M. K., O’Riordan, K. J. & Cryan, J. F. Microbial memories: Sex-dependent impact of the gut microbiome on hippocampal plasticity. *Eur. J. Neurosci.* (2021) doi:10.1111/ejn.15119.
65. Sheng, M. & Kim, E. The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, (2011).
66. Yu, W. *et al.* Gephyrin clustering is required for the stability of GABAergic synapses. *Mol. Cell. Neurosci.* **36**, (2007).
67. Tyagarajan, S. K. & Fritschy, J. M. Gephyrin: A master regulator of neuronal function? *Nature Reviews Neuroscience* vol. 15 (2014).
68. El-Husseini, A. E., Schnell, E., Chetkovich, D. M., Nicoll, R. A. & Brecht, D. S. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science* **290**, (2000).
69. Gómez-Palacio-Schjetnan, A. & Escobar, M. L. Neurotrophins and Synaptic Plasticity. in 117–136 (Springer, Berlin, Heidelberg, 2013). doi:10.1007/7854_2012_231.
70. Zhang, H. T. *et al.* Immunohistochemical distribution of NGF, BDNF, NT-3, and NT-4 in adult rhesus monkey brains. *J. Histochem. Cytochem.* **55**, (2007).

71. McAllister, A. K., Katz, L. C. & Lo, D. C. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annual Review of Neuroscience* vol. 22 (1999).
72. Lu, B., Nagappan, G. & Lu, Y. BDNF and Synaptic Plasticity, Cognitive Function, and Dysfunction. in *Handbook of experimental pharmacology* vol. 220 223–250 (2014).
73. Huang, E. J. & Reichardt, L. F. Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Annual Review of Neuroscience* vol. 24 (2001).
74. Davari, S., Talaei, S. A., Alaei, H. & Salami, M. Probiotics treatment improves diabetes-induced impairment of synaptic activity and cognitive function: Behavioral and electrophysiological proofs for microbiome-gut-brain axis. *Neuroscience* **240**, (2013).
75. Plotkin, J. L. & Wu, C. Neurotrophin biology at NGF 2016: From fundamental science to clinical applications. *International Journal of Developmental Neuroscience* vol. 56 (2017).
76. Blanco, W. *et al.* Synaptic Homeostasis and Restructuring across the Sleep-Wake Cycle. *PLOS Comput. Biol.* **11**, e1004241 (2015).
77. Nuñez-Figueroa, Y. *et al.* The effects of JM-20 on the glutamatergic system in synaptic vesicles, synaptosomes and neural cells cultured from rat brain. *Neurochem. Int.* **81**, 41–47 (2015).
78. de Miranda Ramos, V. *et al.* NRF2 mediates neuroblastoma proliferation and resistance to retinoic acid cytotoxicity in a model of in vitro neuronal differentiation. *Mol. Neurobiol.* **53**, 6124–6135 (2016).
79. Leclercq, S. *et al.* Low-dose penicillin in early life induces long-term changes in murine gut microbiota, brain cytokines and behavior. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
80. Hoban, A. E. *et al.* Behavioural and neurochemical consequences of chronic gut microbiota depletion during adulthood in the rat. *Neuroscience* **339**, (2016).
81. Guida, F. *et al.* Antibiotic-induced microbiota perturbation causes gut endocannabinoidome changes, hippocampal neuroglial reorganization and depression in mice. *Brain. Behav. Immun.* **67**, (2018).
82. Wang, P. *et al.* Antibiotics-induced intestinal dysbacteriosis caused behavioral alternations and neuronal activation in different brain regions in mice. *Mol. Brain* **14**, (2021).
83. Gottmann, K., Mittmann, T. & Lessmann, V. BDNF signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and GABAergic synapses. *Exp. Brain Res.* **199**, 203–234 (2009).
84. Berg, D. A., Belnoue, L., Song, H. & Simon, A. Neurotransmitter-mediated control of neurogenesis in the adult vertebrate brain. *Development* **140**, 2548–2561 (2013).
85. Coley, A. A. & Gao, W. J. PSD95: A synaptic protein implicated in schizophrenia or autism? *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* vol. 82 (2018).
86. Kim, K. C. *et al.* Male-specific alteration in excitatory post-synaptic development and social interaction in pre-natal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. *J. Neurochem.* **124**, (2013).
87. Mayer, E. A., Padua, D. & Tillisch, K. Altered brain-gut axis in autism: Comorbidity or causative mechanisms? *Bioessays* **36**, 933–939 (2014).

88. Wimberley, T. *et al.* Otitis media, antibiotics, and risk of autism spectrum disorder. *Autism Res.* **11**, (2018).
89. Rodakis, J. An n =1 case report of a child with autism improving on antibiotics and a father's quest to understand what it may mean. *Microb. Ecol. Heal. Dis.* **26**, (2015).
90. Bittker, S. S. & Bell, K. R. Acetaminophen, antibiotics, ear infection, breastfeeding, vitamin D drops, and autism: An epidemiological study. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **14**, (2018).
91. Köhler, O. *et al.* Infections and exposure to anti-infective agents and the risk of severe mental disorders: a nationwide study. *Acta Psychiatr. Scand.* **135**, (2017).
92. Łukasik, J. *et al.* Early Life Exposure to Antibiotics and Autism Spectrum Disorders: A Systematic Review. *J. Autism Dev. Disord.* **49**, (2019).
93. Chang, C. H., Lin, C. H. & Lane, H. Y. D-glutamate and gut microbiota in Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 21 (2020).
94. Wang, M. *et al.* Alterations in Gut Glutamate Metabolism Associated with Changes in Gut Microbiota Composition in Children with Autism Spectrum Disorder. *mSystems* **4**, (2019).
95. Olson, C. A. *et al.* The Gut Microbiota Mediates the Anti-Seizure Effects of the Ketogenic Diet. *Cell* **173**, (2018).
96. Palomo-Buitrago, M. E. *et al.* Glutamate interactions with obesity, insulin resistance, cognition and gut microbiota composition. *Acta Diabetol.* **56**, (2019).
97. Wong, C. G., Bottiglieri, T. & Snead III, O. C. GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Ann. Neurol.* **54 Suppl 6**, (2003).
98. Strandwitz, P. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Research* vol. 1693 (2018).
99. Bravo, J. A. *et al.* Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 16050–5 (2011).
100. Arentsen, T., Raith, H., Qian, Y., Forssberg, H. & Heijtz, R. D. Host microbiota modulates development of social preference in mice. *Microb. Ecol. Heal. Dis.* **26**, (2015).
101. Heijtz, R. D. *et al.* Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, (2011).
102. Champagne-Jorgensen, K., Kunze, W. A., Forsythe, P., Bienenstock, J. & McVey Neufeld, K. A. Antibiotics and the nervous system: More than just the microbes? *Brain, Behavior, and Immunity* vol. 77 (2019).
103. Fachi, J. L. *et al.* Butyrate Protects Mice from Clostridium difficile-Induced Colitis through an HIF-1-Dependent Mechanism. *Cell Rep.* **27**, (2019).