

SANDRA APARECIDA DOS REIS

**EFEITO DO TRATAMENTO COM ANTIMICROBIANO E/OU PROBIÓTICO
SOBRE O EXCESSO DE PESO E PARÂMETROS ASSOCIADOS EM
MODELO ANIMAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Maria do Carmo Gouveia Peluzio

Coorientadoras: Damiana Diniz Rosa
Lisiane Lopes da
Conceição

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2019

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

R375e
2019 Reis, Sandra Aparecida dos, 1990-
Efeito do tratamento com antimicrobiano e/ou probiótico
sobre o excesso de peso e parâmetros associados em modelo
animal / Sandra Aparecida dos Reis. – Viçosa, MG, 2019.
109 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Inclui apêndices.

Orientador: Maria do Carmo Gouveia Peluzio.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Ceftriaxona. 2. Microbioma intestinal. 3. Obesidade -
Tratamento adjuvante. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Nutrição e Saúde. Programa de Pós-Graduação
em Ciência da Nutrição. II. Título.

CDD 22. ed. 615.329

SANDRA APARECIDA DOS REIS

**EFEITO DO TRATAMENTO COM ANTIMICROBIANO E/OU PROBIÓTICO
SOBRE O EXCESSO DE PESO E PARÂMETROS ASSOCIADOS EM
MODELO ANIMAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 17 de julho de 2019.

Flávia Xavier Valente

Catarina Maria N. de Oliveira Sediyma

Sarah Aparecida Vieira Ribeiro

Lisiane Lopes da Conceição
(Coorientadora)

Maria do Carmo Gouveia Peluzio
(Orientadora)

A Deus,
A minha família,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter iluminado toda minha trajetória até aqui. E por acalmar minhas inquietações.

Aos meus pais, José Hélio e Maria Aparecida, pelo amor, paciência, ensinamentos, conselhos, incentivo, orações, e por tornar possível minhas escolhas e desejos. Sou infinitamente grata! Amo vocês!

Aos meus irmãos, Edson e Emerson; às minhas cunhadas, Letícia e Brenda; e ao meu sobrinho Samuel pelos momentos de descontração, carinho e apoio.

Aos meus avós, José Fonseca e Leonor, por todo amor e carinho.

Ao meu noivo João Paulo, pelo amor, carinho, apoio e compreensão.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria do Carmo Gouveia Peluzio, por acreditar no meu potencial desde a graduação.

As minha Coorientadoras Dr^a Damiana Diniz Rosa e Lisiane Lopes da Conceição pelo suporte e conselhos.

Aos amigos do LABIN (Laboratório de Bioquímica Nutricional), pela ajuda e conselhos. Em especial às amigas Lisiane e Mariana que caminharam lado a lado comigo durante o doutorado. Obrigada pela ajuda, pelas conversas e risos.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuição científica.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Nutrição e Saúde pela oportunidade de realização deste curso. Aos funcionários da Pró-reitora de Assuntos Comunitários, em especial a Divisão de Alimentação, pelo apoio e incentivo.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a concretização desse trabalho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

RESUMO

REIS, Sandra Aparecida dos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Efeito do tratamento com antimicrobiano e/ou probiótico sobre o excesso de peso e parâmetros associados em modelo animal.** Orientadora: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Coorientadores: Damiana Diniz Rosa e Lisiane Lopes da Conceição.

Considerando a relação da microbiota intestinal com o aumento do risco para o desenvolvimento do excesso de peso e a crescente busca por terapias adjuvantes para o tratamento dessa morbidade que tem como princípio a modulação da composição dessa microbiota. Esse trabalho teve como objetivo investigar o efeito do tratamento contínuo com um antimicrobiano e/ou probiótico sobre o excesso de peso e alterações metabólicas secundárias em modelo animal. Inicialmente camundongos C57BL/6J machos foram submetidos a um protocolo de indução de excesso de peso que teve duração de 12 semanas, no qual os animais foram alimentados com dieta *high-fat* com 60% e uma solução de frutose a 10%. Após esse período, teve início a fase de tratamento, com duração de 4 semanas, no qual os camundongos foram divididos aleatoriamente nos grupos: controle (n = 7), tratado com água destilada; probiótico (n = 7), tratado com 10⁹ UFC de *Lactobacillus gasseri*; antimicrobiano (n = 7), tratado com 500 mg/kg de ceftriaxona; e antimicrobiano mais probiótico (n = 7) que recebeu nas primeiras 2 semanas 500 mg/kg de ceftriaxona e nas 2 semanas subsequentes 10⁹ UFC de *L. gasseri*. Ao término da fase de tratamento os animais foram submetidos a eutanásia e amostras de sangue e tecidos foram coletadas e utilizadas nas análises posteriores. Observou-se que o tratamento com o probiótico levou ao ganho de massa corporal, enquanto o tratamento com o antimicrobiano de forma isolada ou conjugada proporcionou uma redução do ganho de massa. A partir do índice de Lee, da quantidade de tecido adiposo coletada durante a eutanásia e da análise histológica do tecido adiposo abdominal concluiu-se que os resultados apresentados pelos grupos tratados com o antimicrobiano foram decorrentes de uma redução no acúmulo de gordura corporal. Contudo, constatou-se que essa redução foi consequência da alteração na estrutura das vilosidades intestinais provocadas pelo tratamento com o antimicrobiano, a qual teria reduzido a superfície absorptiva. Com relação ao tratamento com o probiótico, é

provável que o aumento da massa corporal tenha influenciado negativamente o metabolismo da glicose e contribuído para uma maior deposição de gordura no tecido hepático. Dessa forma, conclui-se que apesar de o tratamento com ceftriaxona, de forma isolada ou conjugada, ter promovido uma redução na massa de gordura corporal, esse medicamento não deve ser utilizado como adjuvante no tratamento do excesso de peso em função de suas consequências negativas sobre a estrutura das vilosidades intestinais, o que aumenta o risco para o desenvolvimento de doença inflamatória intestinal. Quanto ao *L. gasseri* não existe contraindicação quanto ao seu uso, devendo ser investigado o efeito de seu uso prolongado sobre o excesso de peso.

Palavras-chave: ceftriaxona, microbiota intestinal, tratamento adjuvante, modulação intestinal.

ABSTRACT

REIS, Sandra Aparecida dos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Effect of antimicrobial and/or probiotic treatment on overweight and associated parameters in the animal model.** Adviser: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-advisers: Damiana Diniz Rosa and Lisiane Lopes da Conceição.

Considering the relation between the intestinal microbiota and the increased risk for the development of overweight, the search for adjuvant therapies for the treatment of this morbidity which has as a principle the modulation of the composition of this microbiota is increasing. This study aimed to investigate the effect of continuous antimicrobial and/or probiotic treatment on overweight and secondary metabolic changes in an animal model. Initially male C57BL/6J mice underwent a 12-week overweight induction protocol in which the animals were fed a 60% high-fat diet and a 10% fructose solution. After this period, the 4-week treatment phase began, in which the mice were randomly divided into the following groups: control (n = 7), treated with distilled water; probiotic (n = 7) treated with 10⁹ CFU of *Lactobacillus gasseri*; antimicrobial (n = 7) treated with ceftriaxone 500 mg/kg; and more probiotic antimicrobial (n = 7) who received in the first 2 weeks 500 mg/kg ceftriaxone and in the subsequent 2 weeks 10⁹ CFU of *L. gasseri*. At the end of the treatment phase the animals were euthanized and blood and tissue samples were collected and used for further analysis. Probiotic treatment led to body mass gain, while antimicrobial treatment alone or in combination provided a reduction in mass gain. From the Lee index, the amount of adipose tissue collected during euthanasia and the histological analysis of abdominal adipose tissue, it was concluded that the results presented by the antimicrobial groups were due to a reduction in the accumulation of body fat. However, it was found that this reduction was a consequence of the alteration in the structure of the intestinal villi caused by antimicrobial treatment, which would have reduced the absorptive surface. With regard to probiotic treatment, it is likely that increased body mass negatively influenced glucose metabolism and contributed to increased fat deposition in liver tissue. Thus, it can be concluded that although ceftriaxone treatment, alone or in combination, has promoted a reduction in body fat mass, it should not be used as an adjuvant in the treatment of overweight due to its negative

consequences on the structure of intestinal villi, which increases the risk for the development of inflammatory bowel disease. As for *L. gasseri* there is no contraindication to its use, and the effect of its prolonged use on overweight should be investigated.

Keywords: ceftriaxone, intestinal microbiota, adjuvant therapy, intestinal modulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Estrutura química da ceftriaxona.....	38
Figura 2 Desenho experimental completo.....	60
Figura 3 Fotomicrografia do tecido adiposo abdominal.....	66
Figura 4 Fotomicrografia do tecido hepático.....	67
Figura 5 Fotomicrografia do intestino delgado.....	68
Figura 6 Desenho experimental.....	82
Figura 7 Fotomicrografia do intestino delgado dos grupos experimentais.....	91
Gráfico 1 Massa corporal da fase de indução.....	59
Gráfico 2 Delta do ganho de massa corporal.....	87
Gráfico 3 Histologia do tecido adiposo abdominal.....	89
Gráfico 4 Gotícula de gordura no tecido hepático.....	92
Gráfico 5 Área abaixo da curva glicêmica.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Principais resultados dos estudos experimentais que avaliaram o efeito do tratamento com os antimicrobianos sobre o excesso de peso e alterações metabólicas secundárias.....	31
Tabela 2 Principais resultados dos estudos clínicos que avaliaram o efeito do tratamento com os antimicrobianos sobre o excesso de peso e alterações metabólicas secundárias.....	34
Tabela 3 Efeito do tratamento com os antimicrobianos na composição da microbiota intestinal de indivíduos com excesso de peso.....	35
Tabela 4 Principais resultados dos estudos experimentais que avaliaram o efeito do tratamento com <i>L. gassari</i> sobre o excesso de peso e alterações metabólicas secundárias.....	44
Tabela 5 Principais resultados dos estudos clínicos que avaliaram o efeito do tratamento com <i>L. gassari</i> sobre o excesso de peso e alterações metabólicas secundárias.....	46
Tabela 6 Composição centesimal das dietas experimentais.....	58
Tabela 7 Medidas corporais dos grupos experimentais.....	88
Tabela 8 Teste de permeabilidade intestinal.....	90
Tabela 9 Morfometria do intestino delgado.....	90
Tabela 10 Colesterol sérico e frações.....	94

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

AGCC Ácidos Graxos de Cadeia Curta

ALT Alanina Aminotransferase

AMPK *Adenosine Monophosphateactivated Protein Kinase*

AST Aspartato Aminotransferase

AUC Área Abaixo da Curva

BAL Bactérias do Ácido Lático

ChREBP *Carbohydrate Responsive Element Binding Protein*

DGGE eletroforese em gel com gradiente desnaturante

DGGE *Gel Electrophoresis with Denaturing Gradient*

EP Erro Padrão

GLP-1 *Glucagon-Like Peptide-1*

HbA1c Hemoglobina Glicada

HbA1c *Glycated Hemoglobin*

HDL-colesterol Lipoproteína de Alta Densidade

HOMA *Homeostatic Model Assessment*

IMC Índice de Massa Corporal

IR *Insulin Resistance*

L Lactobacillus

L Lactulose

LDL-colesterol Lipoproteína de Baixa Densidade

LPL Lipase Lipoprotéica

LPS Lipopolissacarídeo

M Manitol

PA Perímetro Abdominal

PBS Tampão Fosfato Salino

PPAR- γ Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama

PT Perímetro Torácico

q-PCR reação em cadeia de polimerase quantitativo

q-PCR *Quantitative Polymerase Chain Reaction*

RI Resistência Insulínica

RPL *Ribosomal protein L*

RT-PCR Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

SCFA *Short Chain Fatty Acids*

SGLT1 Transportador Sódio/Glicose

SREBP-1 *Sterol Responsive Element Binding Protein*

TA Tecido Adiposo

Tg Triglicerídios

TGI Trato Gastrointestinal

TLR4 *Toll-Like Receptor-4*

TTOG Teste de Tolerância Oral à Glicose

UFC Unidades Formadoras de Colônias

UFV Universidade Federal de Viçosa

LISTA DE SÍMBOLOS

↑ Aumentou

↓ Reduziu

↑ *Increased*

↓ *Decreased*

® Marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	18
1.1 Referências Bibliográficas.....	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1 Microbiota Intestinal	22
3.1.1 <i>Microbiota Intestinal e Excesso de Peso</i>	23
3.2 Antimicrobianos.....	28
3.2.2 <i>Antimicrobianos no Tratamento do Excesso de Peso</i>	29
3.2.3 <i>Antimicrobiano Ceftriaxona</i>	38
3.3 Probióticos	39
3.3.1 <i>Probióticos no Tratamento do Excesso de Peso</i>	39
3.3.2 <i>Lactobacillus gasseri</i>	40
3.4 Modelo Animal.....	47
3.5 Referências Bibliográficas.....	48
4 METODOLOGIA GERAL.....	57
4.1 Cálculo Amostral	57
4.2 Modelo Animal.....	57
4.3 Aspectos Éticos.....	57
4.4 Desenho Experimental.....	57
4.5 Massa e Medidas Corporais	61
4.6 Consumo Alimentar, Hídrico e Calórico.....	62
4.7 Teste de Tolerância Oral à Glicose.....	62
4.8 Permeabilidade Intestinal.....	62
4.9 Eutanásia e Extração do Material Biológico.....	63
4.10 Análises Bioquímicas	64

4.11	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.....	64
4.12	Histologia do Tecido Adiposo	65
4.13	Histologia do Tecido Hepático	66
4.14	Histologia do Intestino Delgado.....	67
4.15	Análise Estatística	68
4.16	Referências Bibliográficas.....	69
5	ARTIGO DE REVISÃO: ARTIGO I.....	71
6	ARTIGO II – ORIGINAL.....	78
6.1	Introdução	80
6.2	Materiais e Métodos.....	81
6.2.1	<i>Animais</i>	81
6.2.2	<i>Desenho Experimental</i>	81
6.2.3	<i>Massa e Medidas Corporais</i>	83
6.2.4	<i>Consumo Alimentar, Hídrico e Calórico</i>	83
6.2.5	<i>Teste de Tolerância Oral à Glicose</i>	83
6.2.6	<i>Análises Bioquímicas</i>	84
6.2.7	<i>Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real</i>	84
6.2.8	<i>Permeabilidade Intestinal</i>	84
6.2.9	<i>Análises Histológicas</i>	85
6.2.10	<i>Análise Estatística</i>	86
6.3	Resultados	86
6.3.1	<i>Ganho de Massa e Medidas Corporais</i>	86
6.3.2	<i>Tecido Adiposo</i>	88
6.3.3	<i>Consumo Alimentar, Hídrico e Calórico</i>	89
6.3.4	<i>Saúde Intestinal</i>	89
6.3.5	<i>Saúde Hepática</i>	91
6.3.6	<i>Consequências Metabólicas</i>	92

6.4 Discussão	94
6.5 Conclusão	99
6.6 Referências Bibliográficas.....	99
7 CONCLUSÃO GERAL.....	104
APÊNDICE A - CÁLCULO AMOSTRAL	105
APÊNDICE B - SEQUÊNCIA DE <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS	106
APÊNDICE C - CONSUMO ALIMENTAR, HÍDRICO E CALÓRICO	107
APÊNDICE D - EXPRESSÃO GÊNICA HEPÁTICA E INTESTINAL	108
ANEXO A - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	109

1 INTRODUÇÃO GERAL

A microbiota intestinal compreende todos os microrganismos comensais, simbioses e patogênicos que habitam o intestino delgado e o cólon. Em indivíduos adultos saudáveis, essa microbiota pode incluir mais de 100 trilhões de microrganismos os quais são predominantemente bactérias, anaeróbias e que pertencem principalmente aos filos Firmicutes e Bacteroidetes (LYNCH e PEDERSEN, 2016).

A microbiota intestinal é essencial para a saúde humana, uma vez que auxilia na digestão, principalmente dos polissacarídeos indigeríveis; na maturação e modulação do sistema imune local e sistêmico; na proteção contra a invasão de patógenos; no crescimento celular e angiogênese intestinais; na função endócrina intestinal; na biossíntese de vitaminas, neurotransmissores e outros compostos bioativos; na metabolização e eliminação de sais biliares, fármacos e toxinas; além de influenciar a homeostase e o desenvolvimento de órgãos mais distantes do trato gastrointestinal (TGI), como os ossos e o cérebro (SOMMER e BÄCKHED, 2013). Em função disso, desbalanços na sua composição e função, a denominada disbiose, tem sido associada com o aumento do risco para o desenvolvimento de doenças locais e sistêmicas (LYNCH e PEDERSEN, 2016).

A disbiose intestinal tem sido considerada fator de risco para a ocorrência do excesso de peso (BACKHED et al., 2004), o qual pode evoluir e desencadear o desenvolvimento de doenças metabólicas secundárias que possuem um maior grau de complexidade de tratamento e comprometimento da qualidade de vida (ABESO, 2016). Em função disso, é crescente a busca por novas estratégias terapêuticas adjuvantes para o tratamento do excesso de peso com base na modulação da composição da microbiota intestinal.

O potencial uso dos antimicrobianos no tratamento adjuvante do excesso de peso tem sido investigado (REIS, PELUZIO e BRESSAN, 2018), visto que essa classe de medicamentos é capaz de inibir o crescimento de microrganismos específicos (PIDOT et al., 2014). Espera-se que o consumo dos antimicrobianos por indivíduos com excesso de peso promova um “efeito eubiótico”, favorecendo uma possível modulação positiva na composição da microbiota intestinal (IANIRO, TILG e GASBARRINI, 2016).

No entanto, o uso dos antimicrobianos no tratamento de doenças não infecciosas pode contribuir para o aumento do número de microrganismos resistentes à ação desses medicamentos (BECATTINI, TAUR e PAMER, 2016; WILLYARD, 2017), e portanto, o risco de seu uso no tratamento adjuvante do excesso de peso deve ser mais explorado.

O uso dos microrganismos probióticos como tratamento adjuvante do excesso de peso também tem sido investigado (BRUSAFERRO et al., 2018; KAWANO et al., 2016; MIYOSHI et al., 2014). Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (HILL et al., 2014). Diferentemente dos antimicrobianos, o consumo regular dos probióticos não contribui para o aumento do número de microrganismos resistentes à ação dos antimicrobianos (FAO/WHO, 2001).

Assim, faz-se necessário investigar o efeito do tratamento contínuo com um antimicrobiano e/ou probiótico sobre o excesso de peso e alterações metabólicas secundárias em modelo animal.

1.1 Referências Bibliográficas

BACKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 44, p. 15718-15723, 2004.

BECATTINI, S.; TAUR, Y.; PAMER, E. G. Antibiotic-induced changes in the intestinal microbiota and disease. **Cell Press Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 6, p. 458-478, 2016.

BRUSAFERRO, A. et al. Is it time to use probiotics to prevent or treat obesity ? **Nutrients**, v. 10, n. 1613, p. 1-14, 2018.

FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2001.

HILL, C. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology**, p. 1-9, 2014.

IANIRO, G.; TILG, H.; GASBARRINI, A. Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: between good and evil. **Gut**, v. 65, p. 1906-1915, 2016.

KAWANO, M. et al. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 inhibits adipose tissue inflammation and intestinal permeability in mice fed a high-fat diet. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, n. 23, p. 1-9, 2016.

LYNCH, S. V.; PEDERSEN, O. The human intestinal microbiome in health and disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 375, p. 2369-2379, 2016.

MIYOSHI, M. et al. Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 accompanied by inhibition of pro-inflammatory gene expression in the visceral adipose tissue in diet-induced obese mice. **European Journal of Nutrition**, v. 53, n. 2, p. 599-606, 2014.

PIDOT, S. J. et al. Antibiotics from neglected bacterial sources. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, p. 14-22, 2014.

REIS, S. A. D.; PELUZIO, M. D. C. G.; BRESSAN, J. The use of antimicrobials as adjuvant therapy for the treatment of obesity and insulin resistance: Effects and associated mechanisms. **Diabetes Metabolism Research Reviews**, v. 34, n. 6, p. 1-8, 2018.

Sociedade Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica
Diretrizes brasileiras de obesidade 2016 / ABESO - **Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica**. – 4.ed. - São Paulo, SP.

SOMMER, F.; BÄCKHED, F. The gut microbiota - Masters of host development and physiology. **Nature Reviews**, v. 11, p. 227-238, 2013.

WILLYARD, C. Drug-resistant bacteria ranked. **Nature**, v. 543, p. 15-15, 2017.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito do tratamento contínuo com antimicrobiano e/ou probiótico sobre o excesso de peso e alterações metabólicas secundárias em modelo animal.

2.2 Objetivos Específicos

- Revisar o efeito do uso contínuo dos antimicrobianos no tratamento adjuvante da obesidade e/ou da resistência insulínica, bem como os mecanismos associados;
- Avaliar o ganho de massa corporal e as medidas corporais;
- Determinar o consumo alimentar, hídrico e calórico;
- Investigar o efeito dos tratamentos sobre a tolerância oral à glicose;
- Verificar a influência dos tratamentos na permeabilidade intestinal;
- Determinar o efeito dos tratamentos na concentração sérica do colesterol total e frações, triglicerídios, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase;
- Avaliar a expressão gênica da SREBP-1, acetilCoA carboxilase-1 e ácido graxo sintase no fígado; e do SGLT-1, TLR4 e MyD88 no jejuno;
- Analisar o número e área de adipócitos no tecido adiposo abdominal;
- Contabilizar as gotículas de gordura, os núcleos picnótico e infiltrados inflamatórios no tecido hepático; e
- Analisar a morfometria (altura e largura de vilosidade, e profundidade de cripta) do intestino delgado.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microbiota Intestinal

O termo microbiota foi originalmente estabelecido para se referir a todos os microrganismos comensais, simbiotes e patogênicos que habitam as superfícies corporais de um organismo (SIRISINHA, 2016). Nesse sentido, o termo microbiota intestinal diz respeito a todas as bactérias, fungos, leveduras, *archaea*, vírus e protozoários que habitam o intestino delgado e o cólon (SOMMER e BÄCKHED, 2013).

Nos humanos a microbiota intestinal é a mais abundante e diversa, sendo que indivíduos adultos saudáveis podem possuir mais de 100 trilhões (10^{14}) de microrganismos nessa microbiota. Dessa forma, seu genoma excede em 100 vezes o humano e toda essa microbiota pode contribuir com até 1 kg de peso para o hospedeiro. Ainda, a microbiota intestinal pode compreender de 500 a 1000 espécies diferentes, as quais são predominantemente bactérias anaeróbias (LEY, PETERSON e GORDON, 2006; SOMMER e BÄCKHED, 2013). Dessas bactérias, 70 a 75% pertencem aos filos Firmicutes e Bacteroidetes, sendo o restante formado por bactérias dos filos Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria e Verrucomicrobia. Com relação aos gêneros tem-se que *Bacteroides*, *Clostridium*, *Faecalibacterium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Peptidococcus*, *Peptidostreptococcus* e *Bifidobacterium* compreendem a maioria (SIRISINHA, 2016).

A microbiota intestinal começa a ser formada imediatamente após o nascimento, sendo nessa fase sua composição influenciada pela genética do indivíduo, tipo de parto e ambiente no qual o parto ocorreu. Nos próximos dias a composição será modulada principalmente pelo tipo de alimentação que o recém-nascido recebe (leite materno ou fórmula). Nessa fase, a diversidade e a abundância é significativamente inferior à de um indivíduo adulto, e essa microbiota é dominada pelos filos Actinobacteria e Proteobacteria (SIRISINHA, 2016; WEĞIELSKA e SULIBURSKA, 2016).

Nos próximos 12 meses a composição da microbiota é constantemente modulada por fatores ambientais, tais como o uso de antimicrobianos; a introdução da alimentação complementar; o uso de probióticos, prebióticos ou simbióticos; a ocorrência de doenças infecciosas; as condições de higiene e a localização geográfica. Assim, aos poucos a diversidade e a abundância vão

aumentando e a microbiota passa a ser formada principalmente pelos filos Firmicutes e Bacteroidetes (SIRISINHA, 2016; WEĞIELSKA e SULIBURSKA, 2016).

Essa diversidade microbiana presente no TGI é essencial para a saúde humana, em função disso, a microbiota intestinal pode ser considerada um órgão adicional em nosso organismo (SOMMER e BÄCKHED, 2013), o qual é capaz de auxiliar na digestão, principalmente dos polissacarídeos indigeríveis; na modulação da resposta imune; no desenvolvimento do TGI; na manutenção da homeostase epitelial intestinal; na produção de vitaminas e compostos bioativos; na proteção contra a invasão de potenciais patógenos; além de influenciar a homeostase e o desenvolvimento de órgãos mais distantes do TGI, como os ossos e o cérebro (SOMMER e BÄCKHED, 2013; TJALSMA et al., 2012).

Quando o equilíbrio na composição da microbiota intestinal é alterado, ocorre a disbiose, a qual tem um forte impacto sobre a susceptibilidade do hospedeiro a ocorrência de doenças crônicas, particularmente aquelas associadas com a presença de uma inflamação crônica de baixo grau, como o excesso de peso (SIRISINHA, 2016).

3.1.1 Microbiota Intestinal e Excesso de Peso

O excesso de peso pode ser definido como o acúmulo excessivo de gordura corporal e esse acúmulo aumenta o risco para o desenvolvimento de doenças metabólicas secundárias, tais como a obesidade, resistência insulínica (RI), dislipidemia e síndrome metabólica. Em função disso, é crescente o interesse pelo estudo dessa temática, uma vez que o excesso de peso desencadeia outras doenças que possuem um maior grau de complexidade de tratamento e comprometimento da qualidade de vida (ABESO, 2016).

O excesso de peso apresenta etiologia complexa e multifatorial, podendo ser o resultado da interação de genes, ambiente, estilo de vida e fatores psicológicos (ABESO, 2016). Dentre os fatores ambientais, encontra-se a composição da microbiota intestinal (BACKHED et al., 2004), a qual tem sido cada vez mais investigada com o objetivo de identificar um microrganismo específico ou grupo de microrganismos (*core*) responsáveis pelo desenvolvimento dessa morbidade (BOULANGÉ et al., 2016).

Nesse sentido, alguns estudos observaram que indivíduos com excesso de peso possuem uma maior abundância de bactérias do filo Firmicutes (gram-positivos) e uma menor população de Bacteroidetes (gram-negativos) quando comparados com indivíduos eutróficos (JUMPERTZ et al., 2011; LEY et al., 2005; LEY, RUTH E et al., 2006; TURNBAUGH et al., 2008; TURNBAUGH et al., 2009), contudo o contrário também tem sido constatado (COLLADO et al., 2008; SCHWIERTZ et al., 2010; ZHANG et al., 2009). Assim, para tentar resolver esse dilema passou-se a investigar a composição da microbiota intestinal, desses indivíduos, em nível de gênero e até mesmo espécie a fim de se obter resultados mais fidedignos, uma vez que apesar de pertencerem a filos diferentes, algumas bactérias possuem características metabólicas comuns o que dificulta a associação do risco para o desenvolvimento do excesso de peso a um filo específico (CANI e DELZENNE, 2009). Com isso, já foi observado que indivíduos com excesso de peso possuem uma menor abundância de *Akkermansia muciniphila*, uma bactéria gram-negativa que reside na camada de muco que cobre o intestino (EVERARD et al., 2013), bem como de bactérias produtoras de ácido butírico tais como o gênero *Roseburia* e a espécie *Faecalibacterium prausnitzii* (DUNCAN et al., 2008; JUMPERTZ et al., 2011); e de bactérias probióticas, como as *Bifidobacterium* (CANI et al., 2007; COLLADO et al., 2008).

Contudo, até o momento ainda não é possível atribuir o aumento do risco para o desenvolvimento do excesso de peso a um microrganismo específico ou conjunto desses (SIRISINHA, 2016). Acredita-se que essa dificuldade seja consequência das características inerentes dos participantes dos estudos (idade e genética), das diferenças geográficas e de estilo de vida (dieta, atividade física, tabagismo, alcoolismo, uso de antimicrobianos, probióticos, prebióticos ou simbióticos), do estágio de desenvolvimento da morbididade, do tamanho da amostra e das técnicas utilizadas para a identificação dos microrganismos (FALONY et al., 2016).

O excesso de peso é consequência do desbalanço entre ingestão energética e gasto energético, assim, a microbiota intestinal seria capaz de influenciar o controle da massa corporal por meio de uma variedade de mecanismos que atuam de forma sinérgica contribuindo para a ocorrência desse desbalanço (KOBLYIAK, VIRCHENKO e FALALYEYEVA, 2016). Tais

mecanismos são múltiplos e ainda não são totalmente conhecidos (CANI e DELZENNE, 2009).

Até o momento, já foi observado que a microbiota intestinal de indivíduos com excesso de peso é capaz de extrair maiores quantidades de energia da dieta do que a microbiota de indivíduos eutróficos (BACKHED et al., 2004; JUMPERTZ et al., 2011). Algumas bactérias são capazes de fermentar os carboidratos indigeríveis que chegam ao cólon, com isso são produzidos os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) que atuam como uma fonte extra de energia (KOBLYIAK et al., 2016). Adicionalmente, os AGCC se ligam aos receptores de proteína G (GPR41 e GPR43) presentes na superfície das células enteroendócrinas estimulando a secreção do peptídeo YY, o qual age diminuindo a motilidade intestinal, favorecendo uma maior extração de energia da dieta, uma vez que a microbiota terá mais tempo para metabolizá-la (SAMUEL et al., 2008).

A microbiota intestinal também seria capaz de aumentar a absorção intestinal de macronutrientes, por meio do aumento da expressão do transportador sódio/glicose 1 (SGLT1) (HOOPER et al., 2001) e da densidade capilar intestinal (STAPPENBECK, HOOPER e GORD, 2002), o que contribuiria para o aumento do fornecimento energético para o hospedeiro. Essa maior concentração de glicose na corrente sanguínea ativaria a secreção pancreática de insulina, a qual atuará no fígado levando ao aumento da expressão das proteínas mensageiras *carbohydrate responsive element binding protein* (ChREBP) e *sterol responsive element binding protein* (SREBP-1), as quais consequentemente ativarão as enzimas acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintase, estimulando o processo de lipogênese, o que pode levar também a esteatose hepática (BACKHED et al., 2004).

Outro mecanismo utilizado pela microbiota intestinal diz respeito à supressão da atividade de proteínas relacionadas com o armazenamento e o metabolismo dos macronutrientes. Um desses mecanismos age suprimindo a atividade do *fasting induced adipose factor* (Fiaf, também conhecido como ANGPTL4), um fator que é produzido nos tecidos adiposo branco e amarelo, fígado e intestino (MUSSO, GAMBINO e CASSADER, 2010). Em estudo conduzido por Bäckhed et al. (2004) com camundongos *Fiaf knockout (-/-)* e selvagens mantidos em condições *germ-free* e convencionais concluiu-se que

a microbiota pode suprimir a expressão do Fiaf. Com isso, a atividade da enzima lipase lipoproteica (LPL) não é inibida, o que contribuiria para o acúmulo dos triglicerídios nos adipócitos e conseqüentemente para a hipertrofia do tecido adiposo. Adicionalmente, o Fiaf é capaz de induzir a expressão do fator de transcrição nuclear do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR- γ) que é um importante receptor nuclear, associado à sensibilização do organismo a insulina, regulação da concentração sérica de glicose plasmática e captação/armazenamento de lipídios em órgãos periféricos (CONTERNO et al., 2011). Assim, esse estudo estabeleceu a importância do Fiaf como um mediador da ação da microbiota intestinal sobre o armazenamento de gordura periférica.

Outra proteína que pode ter sua atividade suprimida é a enzima *adenosine monophosphateactivated protein kinase* (AMPK) que é responsável pelo controle do estado energético celular, uma vez que regula a ativação de enzimas chaves da oxidação lipídica mitocondrial, tais como acetil-CoA carboxilase e carnitina palmitol transferase 1, no fígado e no músculo esquelético (MUSSO et al., 2010). Nesse sentido, já foi observado que camundongos *germ-free* exibem uma maior concentração de AMPK fosforilada do que animais convencionais, o que contribui para o aumento da oxidação dos ácidos graxos e do gasto energético, induzindo a uma menor massa corporal (BACKHED et al., 2007). Porém, o mecanismo molecular utilizado pela microbiota para suprimir o Fiaf e desativar o AMPK não é conhecido (KOBLYIAK et al., 2016).

Um dos mecanismos mais estudados no que diz respeito a relação entre a microbiota intestinal e obesidade envolve o sistema imune. O lipopolissacarídeo (LPS), presente na parede celular das bactérias gram-negativas, ao entrar em contato com o complexo CD14/TLR-4 presentes na superfície das células imunes e de órgãos periféricos (hepatócitos, adipócitos e miócitos) desencadeariam um processo inflamatório crônico de baixo grau, o qual prejudicaria o bom funcionamento do metabolismo do hospedeiro, contribuindo para o desenvolvimento do excesso de peso (KOBLYIAK et al., 2016). Esse mecanismo foi estabelecido por Cani et al. (2007) que observaram que após 4 semanas de dieta *high-fat* camundongos selvagens apresentavam excesso de peso, sendo essa mudança acompanhada de uma diminuição na

população de bactérias gram-positivas na microbiota intestinal e de aumento na concentração sérica de LPS (2 a 3 vezes maior do que o controle). Esse aumento do LPS passou então a ser denominado de endotoxemia metabólica, uma vez que apesar de elevada, a concentração sérica do LPS encontra-se em valores inferiores ao que é comumente observado na sepse. Nesse mesmo estudo observou-se que pequenas infusões subcutâneas de LPS eram suficientes para levar ao ganho de massa e a RI. Ainda, camundongos *CD14*^{-/-} mostraram-se resistentes ao desenvolvimento do excesso de peso e da RI induzidas tanto pela dieta *high-fat* quanto pelas infusões de LPS (CANI et al., 2007). Assim, provou-se que a interação do LPS com o sistema CD14/TLR pode desencadear alterações metabólicas que culminariam no excesso de peso.

Adicionalmente, o LPS seria capaz de afetar o funcionamento do sistema endocanabinóide, o qual é regulador chave da homeostase energética, do metabolismo de carboidratos e de lipídios, e da permeabilidade intestinal (MUCCIOLI et al., 2010).

Para que o LPS possa interagir com os receptores das células imunes e demais células do hospedeiro é necessário que a barreira intestinal esteja alterada de modo que a permeabilidade intestinal aumente. A barreira intestinal é composta por uma camada de células epiteliais, células do sistema imune, células calciformes e de Paneth, proteínas de junção celular, camadas de muco, imunoglobulina A, pH, peptídeos antimicrobianos e os próprios microrganismos que compõem a microbiota. Sabe-se que alguns microrganismos presentes na microbiota intestinal podem alterar a barreira intestinal, de modo que essa se torne mais ou menos permeável (KAHOULI, TOMARO-DUCHESNEAU e PRAKASH, 2013). Dessa forma, algumas bactérias gram-negativas, as quais podem aumentar em caso de disbiose, são capazes de alterar a distribuição das proteínas de junção celular contribuindo para o aumento da permeabilidade intestinal (PARK e BAE, 2015). Adicionalmente, indivíduos com excesso de peso podem apresentar uma menor abundância de bactérias produtoras de ácido butírico (JUMPERTZ et al., 2011), o qual é essencial para o bom funcionamento da barreira intestinal, uma vez que atua como substrato energético preferencial para as células epiteliais,

estimula a produção de muco pelas células caliciformes e afeta a expressão das proteínas de junção celular (SAAD, SANTOS e PRADA, 2016).

Assim, a depender de sua composição a microbiota intestinal pode influenciar a massa corporal de seu hospedeiro por meio do aumento da extração de energia da dieta, do aumento da absorção intestinal de macronutrientes, da modulação da expressão e ação de proteínas relacionadas com o armazenamento e o metabolismo energético, e da inflamação crônica de baixo grau.

3.2 Antimicrobianos

Os antimicrobianos são substâncias artificiais sintetizadas em laboratório, que possuem como principal função inibir o crescimento de microrganismos específicos. Por sua vez, os antibióticos são substâncias que possuem a mesma função, mas que são sintetizadas por espécies específicas de fungos ou bactérias. Assim, em função da demanda por esses medicamentos, usualmente são utilizados os antimicrobianos por serem facilmente produzidos em larga escala (PIDOT et al., 2014).

Devido ao seu efeito modulatório sobre a composição da microbiota intestinal, têm sido investigados o potencial uso no tratamento de morbidades crônicas não-infecciosas (IANIRO, TILG e GASBARRINI, 2016) como o excesso de peso (CARVALHO et al., 2012; DEL FIOLE et al., 2014; MEMBREZ et al., 2008; MURPHY et al., 2012).

Em indivíduos com excesso de peso espera-se que o uso contínuo do antimicrobiano provoque um “efeito eubiótico”, ou seja, que as bactérias relacionadas com o aumento do risco para o desenvolvimento dessa doença sejam eliminadas e com isso, bactérias benéficas presentes na microbiota intestinal possam proliferar e recolonizar o ambiente, modulando o metabolismo do hospedeiro e contribuindo para a melhora do estado de saúde do mesmo (IANIRO et al., 2016). Contudo, a escolha de um antimicrobiano que proporcione tal efeito não é tarefa fácil, visto que até o momento os microrganismos associados com o aumento do risco para o desenvolvimento do excesso de peso não foram identificados. Usualmente um antimicrobiano possui maior espectro de atuação contra bactérias gram-positivas ou gram-negativas, assim, durante o tratamento tanto bactérias envolvidas no aumento

quanto na redução do risco para o desenvolvimento do excesso de peso podem ser eliminadas, o que dificulta a obtenção do "efeito eubiótico".

Assim, diferentes antimicrobianos têm sido investigados quanto ao seu potencial uso no tratamento adjuvante do excesso de peso (Tabelas 1 e 2).

3.2.2 Antimicrobianos no Tratamento do Excesso de Peso

São poucos os estudos que investigaram o efeito terapêutico dos antimicrobianos no excesso de peso, principalmente estudos clínicos. Assim, até o momento, a maioria dos estudos não encontrou alterações nos parâmetros associados com o excesso de peso após o tratamento (Tabela 1 e 2). Tais resultados podem ser consequência dos diferentes desenhos dos estudos (tipo, dose e duração dos tratamentos), da população investigada e dos modelos animais utilizados (CARVALHO et al., 2012). Ainda, sabe-se que o efeito modulatório do antimicrobiano varia em função de sua farmacocinética, farmacodinâmica, via de administração e espectro de atuação. Além disso, características inerentes do consumidor tais como idade, composição inicial da microbiota intestinal e estilo de vida também influenciariam no resultado final (IANIRO et al., 2016).

Para reduzir a peso corporal e/ou a adiposidade, é indispensável que ocorra um déficit energético, o que não parece ocorrer durante o tratamento com o antimicrobiano. Nesse sentido, parâmetros que podem influenciar o metabolismo energético não foram modificados pelo tratamento, como a quantidade de energia extraída da dieta (DI LUCCIA et al., 2015; MATHUR et al., 2016), o tipo de substrato energético utilizado pelo organismo (REIJNDERS et al., 2016), a velocidade do esvaziamento gástrico (MATHUR et al., 2016; MIKKELSEN et al., 2015), o apetite (MIKKELSEN et al., 2015) e o consumo de alimentos (CHOU, MEMBREZ e BLANCHER, 2008; DI LUCCIA et al., 2015; HWANG et al., 2015; JENA et al., 2013; MIKKELSEN et al., 2015; MURPHY et al., 2012; VRIEZE et al., 2014).

Outra via que vem sendo investigada quanto ao efeito do tratamento com o antimicrobiano no excesso de peso diz respeito à estimulação do sistema imune pelo LPS presente na parede celular das bactérias gram-negativas. Essa estimulação predispõe o hospedeiro ao desenvolvimento de um estado inflamatório crônico de baixo grau, o qual contribui para o

desenvolvimento do excesso de peso e a obesidade e as alterações metabólicas secundárias (CANI et al., 2007). Assim, para impedir que tal estimulação ocorra, o antimicrobiano pode atuar reduzindo a população de bactérias gram-negativas na microbiota intestinal ou melhorando a barreira intestinal de seu hospedeiro, de modo que o LPS presente no lúmen intestinal não seja absorvido.

Nesse sentido, alguns estudos têm constatado que o tratamento com o antimicrobiano foi capaz de reduzir as concentrações séricas de LPS (CANI et al., 2008; CARVALHO et al., 2012; CHOU et al., 2008; DI LUCCIA et al., 2015; GHOSH et al., 2014; MEMBREZ et al., 2008), bem como das citocinas pró-inflamatórias (CANI et al., 2008; CARVALHO et al., 2012; CHOU et al., 2008; DI LUCCIA et al., 2015; MEMBREZ et al., 2008; MURPHY et al., 2012; RUNE et al., 2013).

O tratamento com antimicrobianos com espectro de ação contra bactérias gram-positivas pode aumentar a população de bactérias gram-negativas, especialmente as que pertencem ao filo Proteobacteria (Tabela 3), o que não é desejável se considerarmos que esse efeito aumentaria a concentração luminal de LPS. No entanto, o tratamento com antimicrobiano pode causar uma redução na permeabilidade intestinal (CANI et al., 2008; GHOSH et al., 2014; REIJNDERS et al., 2016), inclusive quando são utilizados antimicrobianos com um espectro de ação contra bactérias gram-positivas (HWANG et al., 2015). Assim, esses antimicrobianos poderiam ser utilizados no tratamento adjuvante do excesso de peso, desde que não aumentem a permeabilidade intestinal dos consumidores.

Tabela 1 - Principais resultados dos estudos experimentais que avaliaram o efeito do tratamento com os antimicrobianos sobre o excesso de peso e alterações metabólicas secundárias.

Referência	Modelo Animal	Dieta experimental	Intervenção	Principais Resultados (tratamento vs controle)
Di Luccia et al. (2015)	Ratos Sprague-Dawley machos com 14 semanas de vida	Dieta rica em frutose (20,4%)	Ampicilina (1g/L) e neomicina (0,5 g/L) Na água de beber 8 semanas	Não alterou a massa corporal ↑ a sensibilidade a insulina e a tolerância a glicose
Hwang et al. (2015)	Camundongos C57BL/6J machos com 8 semanas de vida	Dieta <i>high-fat</i> com 60% de gordura	Vancomicina (0,5 g/L) e bacitracina (1g/L) Na água de beber 4 semanas	Não alterou a massa e a massa de gordura corporal ↓ a insulinemia ↑ a sensibilidade a insulina e a tolerância a glicose
Rajpal et al. (2015)	Camundongos C57BL/6 machos com 14 semanas de vida.	Dieta <i>high-fat</i> com 45% de gordura	Ceftazidima (50, 150 ou 500 mg/kg) ou vancomicina (50, 150 ou 500 mg/kg) misturadas na dieta 2 semanas	<i>Ceftazidima</i> : ↓ massa corporal e gordura corporal (150 ou 500 mg/Kg); glicemia e insulinemia (500 mg/Kg). <i>Vancomicina</i> : ↓ massa corporal (150 mg/Kg).
Rajpal et al. (2015)	Ratos Zucker (ZDF-Lepr ^{fa} /Crl) machos com 7 semanas de vida.	Dieta padrão com 17% de gordura	Ceftazidima (500 mg/kg) Via gavagem 2 semanas	↓ HbA1c, glicemia de jejum e insulinemia ↑ a massa corporal
Del Fiol et al. (2014)	Ratos Wistar machos	Dieta padrão	Amoxicilina 150 mg/kg Via gavagem 2 semanas	Não alterou a massa e a composição corporal

Referência	Modelo Animal	Dieta experimental	Intervenção	Principais Resultados (tratamento vs controle)
Ghosh et al. (2014)	Camundongos LDLR-/- machos com 10 semanas de vida	Dieta com 21% de gordura e 0,15% de colesterol	Neomicina (100mg/dia) polimixina B (10mg/dia) Na água de beber 16 semanas	Não alterou a massa corporal e a glicemia de jejum ↑ a tolerância a glicose
Jena et al. (2013)	Ratos Wistar machos com 8 a 10 semanas de vida	Dieta com 65% de frutose	Cefdinir Via gavagem 4 semanas	↓ a massa e a gordura corporal, a glicemia, ↑ a tolerância a glicose
Rune et al. (2013)	Camundongos C57BL/6NTac machos com 0 dias de vida	Dieta <i>high-fat</i> com 60% de lipídios	Ampicilina (1 g/L) Na água de beber 5 semanas	Não alterou a massa corporal e a insulinemia ↓ a HbA1c ↑ a tolerância a glicose
Bech-Nielsen et al. (2012)	Camundongos C57BL/6 fêmeas com três semanas de vida.	Dieta padrão com 12,6% de gordura	Ampicilina (1 g/L) ou eritromicina (1 g/L) Na água de beber 5 semanas	Não alterou a massa corporal ↓ a glicemia de jejum ↑ a tolerância a glicose
Carvalho et al. (2012)	Ratos Swiss machos com 6 semanas de vida.	Dieta <i>high-fat</i> com 55% de gordura	Ampicilina (1 g/L), neomicina (1 g/L) e metronidazol (1 g/L) Na água de beber 8 semanas	Não alterou o tamanho dos adipócitos ↓ a massa corporal ↑ a tolerância a glicose e a sensibilidade a insulina
Murphy et al. (2012)	Camundongos C57BL/6J machos com 7 semanas de vida	Dieta <i>high-fat</i> com 45% de lipídios	Vancomicina (2mg/dia) Via gavagem 8 semanas	Não alterou a insulinemia ↓ o ganho de massa

Referência	Modelo Animal	Dieta experimental	Intervenção	Principais Resultados (tratamento vs controle)
Cani et al. (2008)	Camundongos C57BL/6J machos com 12 semanas de vida	Dieta <i>high-fat</i> com 72% de lipídios	Ampicilina (1 g/L) e neomicina (0,5 g/L) Na água de beber 4 semanas	↓ a massa corporal e o tamanho dos adipócitos, insulinemia e a glicemia de jejum ↑ a tolerância a glicose
Cani et al. (2008)	Camundongos <i>ob/ob</i> machos com 6 semanas de vida	Dieta padrão	Ampicilina (1 g/L) e neomicina (0,5 g/L) Na água de beber 4 semanas	↓ a massa corporal e o tamanho dos adipócitos, insulinemia e a glicemia de jejum
Chou et al. (2008)	Camundongos <i>ob/ob</i> machos	Dieta padrão	Norfloxacina (1 g/L) e ampicilina (1 g/L) Na água de beber 2 semanas	Não alterou a massa corporal ↓ a glicemia de jejum e a insulinemia ↑ a tolerância a glicose e a sensibilidade a insulina
Chou et al., (2008)	Camundongos C57BL/6 machos	Dieta <i>high-fat</i>	Polimixina B (0,5 g/L) e neomicina (1 g/L) Na água de beber 2 semanas	Não alterou a massa corporal e a glicemia de jejum
Membrez et al. (2008)	Camundongos <i>ob/ob</i> machos com 8 a 10 semanas de vida	Dieta padrão	Norfloxacina (1 g/L) e ampicilina (1 g/L) Na água de beber 17 dias	Não alterou a massa corporal ↓ a glicemia de jejum e a insulinemia ↑ a tolerância a glicose
Membrez et al. (2008)	Camundongos C57BL/6J machos com 6 a 7 semanas de vida	Dieta <i>high-fat</i> com 60% de lipídios	Norfloxacina (1 g/L) e ampicilina (1 g/L) Na água de beber 17 dias	Não alterou a massa e gordura corporal ↓ a glicemia de jejum e a tolerância a glicose

Fonte: elaborada pelo autor. Abreviações e símbolos: HbA1c: hemoglobina glicada; ↓: reduziu; ↑: aumentou.

Tabela 2 - Principais resultados dos estudos clínicos que avaliaram o efeito do tratamento com os antimicrobianos sobre o excesso de peso e alterações metabólicas secundárias.

Referência	Participantes do estudo	Desenho do estudo	Intervenção	Principais Resultados (tratamento vs controle)
Mathur et al. (2016)	11 indivíduos adultos, obesos, pré-diabéticos e com hálito metano positivo.	Transversal	Rifaximina (1650 mg/dia) e neomicina (1000mg/dia) 10 dias	Não alterou a massa corporal ↓ a glicemia de jejum, a insulinemia
Reijnders et al. (2016)	57 homens adultos, caucasianos, com excesso de peso ou obesos, intolerantes a glicose e resistentes a insulina.	Randomizado, duplo cego, controlado com placebo.	Amoxicilina ou vancomicina 1500mg/dia 7 dias	Não alterou a massa corporal, o tamanho e o número de adipócitos, a glicemia de jejum, a insulinemia, o índice HOMA, e a sensibilidade do tecido adiposo e do fígado a insulina.
Mikkelsen et al. (2015)	12 homens adultos, caucasianos, saudáveis e eutróficos.	Prospectivo com reavaliação 180 dias após a intervenção.	Vancomicina (500 mg/dia) e gentamicina (40 mg/dia) e meropenem (500 mg/dia) 4 dias	Não alterou a massa corporal, a glicemia de jejum, a insulinemia, o índice HOMA, e as concentrações séricas de peptídeo C e HbA1c.
Vrieze et al. (2014)	20 homens adultos caucasianos, obesos, e com síndrome metabólica.	Randomizado, simples cego, controlado com placebo.	Amoxicilina ou vancomicina 1500mg/dia 7 dias	Não alterou a massa corporal, a insulinemia e a glicemia de jejum.

Fonte: elaborada pelo autor. Abreviações e símbolos: HbA1c: hemoglobina glicada; HOMA: *homeostatic model assessment* (índice de insulino-resistência), ↓: reduziu.

Tabela 3 - Efeito do tratamento com os antimicrobianos na composição da microbiota intestinal de indivíduos com excesso de peso.

Referência	Amostra	Método	Antimicrobiano	Principais Resultados (tratamento vs controle)
Mathur et al. (2016)	Fezes	q-PCR	Rifaximina e neomicina	↓ <i>Methanobrevibacter smithii</i> .
Reijnders et al. (2016)	Fezes	Microarranjo (<i>Human Intestinal Tract Chip analysis</i>)	Vancomicina	↑ Filo Proteobacteria, membros do cluster de <i>Clostridium</i> IX, gênero <i>Enterococcus</i> e espécie <i>Lactobacillus plantarum</i> ↓ Filo Firmicutes, membros dos clusters de <i>Clostridium</i> IV e XIV como as espécies <i>Coprococcus eutactus</i> , <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , <i>Anaerostipes caccae</i> e <i>Clostridium leptum</i>
Di Luccia et al. (2015)	Conteúdo cecal	Pirosequenciamento	Ampicilina e neomicina	↑ Filos Proteobacteria e Bacteroidetes, e a classe Bacteroidia. ↓ Classe Bacilli, e os gêneros <i>Coprococcus</i> e <i>Ruminococcus</i> .
Hwang et al. (2015)	Conteúdo cecal	Pirosequenciamento	Vancomicina e Bacitracina	↑ Filo Proteobacteria e a espécie <i>Escherichia coli</i> ↓ Filo Firmicutes, principalmente a família Lachnospiraceae; e o filo Bacteroidetes, principalmente a família Porphyromonadaceae
Mikkelsen et al. (2015)	Fezes	Plaqueamento em meios específicos	Vancomicina, gentamicina e meropenem	↓ Grupos anaeróbios totais e coliformes, gêneros <i>Enterococci</i> e <i>Bifidobacterium</i>
Rajpal et al. (2015)	Fezes	Sequenciamento de DNA metagenômico	Vancomicina	↑ Filo Proteobacteria.
Rajpal et al. (2015)	Fezes	Sequenciamento de DNA metagenômico	Ceftazidima	↑ Filo Firmicutes, principalmente o gênero <i>Lactobacillus</i> ↓ Filo Bacteroidetes e classe Clostridia

Referência	Amostra	Método	Antimicrobiano	Principais Resultados (antimicrobiano vs placebo)
Vrieze et al. (2014)	Fezes	Microarranjo (<i>Human Intestinal Tract Chip phylogenetic</i>)	Vancomicina	↑ Filo Proteobacteria, principalmente os gêneros <i>Haemophilus</i> e <i>Serratia</i> , e a espécie <i>Escherichia coli</i> . e a espécie <i>Lactobacillus plantarum</i> . ↓ Filo Firmicutes, principalmente os clusters de <i>Clostridium</i> IV e XIVa, e as espécies <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> e <i>Eubacterium hallii</i> .
Jena et al. (2013)	Conteúdo cecal	Plaqueamento em meios específicos	Cefdinir	↓ Família Enterobacteriaceae.
Carvalho et al. (2012)	Fezes	Análises de metagenômica (BLASTX)	Ampicilina, neomicina e metronidazol	↑ Filo Proteobacteria. ↓ Filos Bacteroidetes, Verrucomicrobia e Firmicutes.
Murphy et al. (2012)	Fezes	Pirosequenciamento	Vancomicina	↑ Filo Proteobacteria; famílias Enterobacteriaceae; Streptococcaceae; Desulfovibrionaceae e Alcaligenaceae; gêneros <i>Lactococcus</i> , <i>Sutterella</i> e <i>Desulfovibrio</i> . ↓ Filos Firmicutes, Bacteroidetes; famílias Clostridiaceae, Bacteroidaceae, Porphyromonadaceae e Deferribacteres; e os gêneros <i>Bacteroides</i> , <i>Clostridium</i> e <i>Odoribacter</i> .
Cani et al. (2008)	Conteúdo cecal dos camundongos <i>ob/ob</i>	DGGE	Ampicilina e neomicina	↓ Gêneros <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Bacteroides</i> e <i>Prevotella</i> .
Cani et al. (2008)	Conteúdo cecal dos animais com dieta <i>high-fat</i>	DGGE	Ampicilina e neomicina	↑ Gêneros <i>Lactobacillus</i> , <i>Bacteroides</i> e <i>Prevotella</i> . ↓ Gênero <i>Bifidobacterium</i> .
Chou et al. (2008)	Fezes	Plaqueamento em meios específicos.	Norfloxacina	↓ Família Enterobacteriaceae.
Chou et al. (2008)	Fezes	Plaqueamento em meios específicos.	Ampicilina	↓ Gênero <i>Bacteroides</i> .

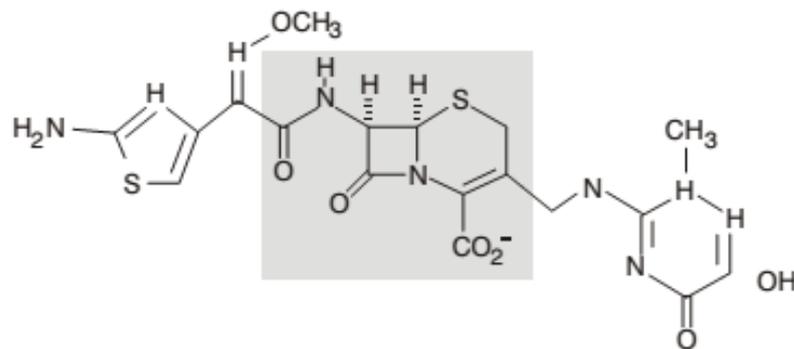
Referência	Amostra	Método	Antimicrobiano	Principais Resultados (antimicrobiano vs placebo)
Membrez et al. (2008)	Conteúdo cecal	Plaqueamento em meios específicos.	Norfloxacina	↓ Família Enterobacteriaceae.
Membrez et al. (2008)	Conteúdo cecal	Plaqueamento em meios específicos.	Ampicilina	↓ Gênero <i>Bacteroides</i> .

Fonte: elaborada pelo autor. Abreviações e símbolos: DGGE: eletroforese em gel com gradiente desnaturante, q-PCR: reação em cadeia de polimerase quantitativo, ↑: aumentou, ↓: reduziu.

3.2.3 Antimicrobiano Ceftriaxona

O antimicrobiano ceftriaxona é uma cefalosporina de terceira geração que pertence ao grupo dos antimicrobianos β -lactâmicos (Figura 1). As cefalosporinas são semissintéticas derivadas da cefalosporina C que é naturalmente produzido pelo fungo *Cephalosporium acremonium*. As cefalosporinas podem ser classificadas em quatro gerações de acordo com seu espectro de atuação, assim as de primeira geração são ativas, principalmente, contra os cocos gram-positivos. Por sua vez, as de segunda geração são mais ativas contra as bactérias gram-negativas, enquanto as de terceira e quarta são ainda mais ativas contra as bactérias gram-negativas quando comparadas as cefalosporinas de segunda geração (ALLAM et al., 2017).

Figura 1 - Estrutura química da ceftriaxona.



Fonte: Rosária e Grumach (2006). Destaque para o anel β -lactâmico.

A ceftriaxona tem sido amplamente utilizada para o tratamento de infecções severas dos tratos respiratório e excretor, bem como no pós-operatório cirúrgico e no tratamento da meningite infantil. Os mecanismos de ação da ceftriaxona consistem na (1) ligação a proteínas específicas ligadoras de penicilina Ia, Ib, e III; (2) inibição da síntese da parede celular; e (3) ativação de enzimas autolíticas na parede celular (ALLAM et al., 2017).

As vias de administração preferencial da ceftriaxona são a parenteral e intramuscular, isso por que em função de sua estrutura química esse antimicrobiano exibe uma baixa afinidade pelo transportador H^+ /PEPT1, o qual é o principal responsável pelo transporte intestinal da maioria dos antimicrobianos (MRESTANI et al., 2004).

3.3 Probióticos

O potencial uso dos microrganismos para a modulação da composição da microbiota intestinal a fim de proporcionar benefícios à saúde foi proposto pela primeira vez em 1907 por Eli Metchnikoff, ganhador do Prêmio Nobel de Medicina de 1908 (FAO/WHO, 2001).

Para exercer seu efeito modulatório os microrganismos probióticos devem ser capazes de sobreviver a passagem pelo TGI e chegar em quantidades suficientes no intestino delgado ou cólon onde colonizarão (FAO/WHO, 2001). Para tanto, estabeleceu-se que devem ser consumidos diariamente no mínimo de 10^8 a 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) do microrganismo viável por mL ou g no produto final pronto para consumo, assim, um número suficiente resistirá aos efeitos deletérios do suco gástrico e da bile, sendo capazes de colonizar o lúmen intestinal (BRASIL, 2008).

Os microrganismos probióticos possuem um longo histórico de uso sem que efeitos adversos graves à saúde de seus consumidores sejam relatados. A fim de assegurar que esse histórico não mude, a FAO/WHO recomenda que durante a seleção de um microrganismo para uso como probiótico sejam realizados testes que assegurem que a estirpe não seja capaz de transmitir genes que habilitem a resistência a medicamentos, principalmente contra os antimicrobianos (FAO/WHO, 2001).

3.3.1 Probióticos no Tratamento do Excesso de Peso

Em função do potencial modulatório que os probióticos possuem sobre a composição da microbiota intestinal, estudos têm sendo realizados com o objetivo de investigar se o consumo contínuo desses microrganismos é capaz de prevenir e até mesmo tratar o excesso de peso. Os resultados são ainda controversos, provavelmente em função das características inerentes dos participantes dos estudos (idade e genética), dos diferentes modelos experimentais, das diferenças geográficas e de estilo de vida (dieta, atividade física, tabagismo e alcoolismo), do estágio de desenvolvimento da doença, do tamanho da amostra, do esquema de tratamento (dose e duração) e da forma de apresentação do probiótico (cápsulas, liofilizado, em leites fermentados, inativados pelo calor) (CANI e HUL, 2015; MILLION e RAOULT, 2013; RAZMPOOSH et al., 2016).

Os mecanismos utilizados pelos probióticos são múltiplos, podendo uma única estirpe utilizar mais de um mecanismo, contudo, tais mecanismos são altamente estirpe-específico, o que ajuda a justificar os diferentes resultados constatados nos estudos (CANI e HUL, 2015).

De modo geral acredita-se que o consumo contínuo dos probióticos possa levar à perda de massa corporal por meio da: (1) modulação da composição da microbiota intestinal; (2) melhora da barreira intestinal; (3) modulação do metabolismo do hospedeiro; (4) produção dos AGCC; (5) imunomodulação; (6) modulação do sistema endocanabinóide; e (7) produção dos hormônios enteroendócrinos (BARZ et al., 2015; CANI e HUL, 2015; EVERARD et al., 2013; PRADOS-BO et al., 2015).

3.3.2 *Lactobacillus gasseri*

O gênero *Lactobacillus* compreende um grande número de espécies que são consideradas probióticas (FAO/WHO, 2001). Essas bactérias são gram-positivas, incapazes de formar esporos, desprovidas de flagelos, exibindo forma bacilar ou cocobacilar e são microaerófilas ou anaeróbios. Os *Lactobacillus* são homofermentativos, sendo o principal produto do seu metabolismo o ácido láctico e em função disso, essas bactérias pertencem ao grupo das bactérias do ácido láctico (BAL) (DI LUCCIA et al., 2013).

Uma das espécies probióticas presente nesse gênero é *Lactobacillus gasseri* (inicialmente classificada como *Lactobacillus acidophilus* grupo B1), a qual pode ser naturalmente encontrada no leite materno e nas microbiotas vaginal e intestinal (CARROLL et al., 2007; DI LUCCIA et al., 2013; JUNG et al., 2013). Por ser de origem humana, quando administrada em quantidades adequadas, *L. gasseri* é capaz de sobreviver à passagem pelo TGI e colonizar o intestino delgado (KAWASE et al., 2011; KIM et al., 2006; MIYOSHI et al., 2014; RITTER, KOHLER e VON AH, 2009). Nesse sentido, Fujiwara et al. (2001) constataram que essa bactéria pode ser encontrada na microbiota intestinal até 90 dias após a interrupção do consumo, tal resultado seria consequência da alta capacidade de adesão às células epiteliais intestinais que essa bactéria exibe (ROGELJ e MATIJAŠIĆ, 2006).

Estudos têm sugerido que o consumo contínuo de *L. gasseri* pode auxiliar na perda de massa corporal (Tabelas 4 e 5), para tanto, essa bactéria utilizaria diferentes mecanismos que atuariam em sinergismo proporcionando tal benefício.

Dentre esses mecanismos, já foi constatado que *L. gasseri* é capaz de inibir a absorção intestinal de lipídios (HAMAD et al., 2009; KADOOKA et al., 2010; OGAWA et al., 2014), tal resultado seria consequência da capacidade que essa bactéria possui de se ligar as moléculas de lipídios presentes no lúmen intestinal, sendo ambos eliminados juntamente com as fezes. Além disso, *L. gasseri* desconjuga os sais biliares, os quais nessa forma não são capazes de formar micelas estáveis e auxiliar nos processos de digestão e absorção (USMAN e HOSONO, 1999; YONEJIMA, USHIDA e MORI, 2013). Ainda, Ogawa et al. (2015) constataram que *L. gasseri* SBT0317 e JCM1131 são capazes de inibir a atividade da enzima lipase pancreática de forma dose-dependente, com isso são formadas micelas grandes as quais não são absorvidas de forma eficiente. Com relação à absorção dos demais macronutrientes, até o momento, nada foi relatado.

Outro mecanismo utilizado por *L. gasseri* diz respeito à modulação da composição da microbiota intestinal. Assim, o consumo contínuo dessa bactéria é capaz de reduzir a população de coliformes (USMAN e HOSONO, 2000) e de bactérias do gênero *Staphylococcus* (FUJIWARA et al., 2001), bem como aumentar a população de bactérias do grupo *Clostridium* IV, principalmente a espécie *Faecalibacterium prausnitzii* (SAWADA et al., 2016; YODA et al., 2012), além da população de *Lactobacillus* (USMAN e HOSONO, 2000; YODA et al., 2012). A capacidade modulatória exibida por *L. gasseri* seria consequência de sua capacidade de produzir bacteriocinas, tais como a gassericina A, K7 A, K7 B e T, e as acidocinas LF221 A e B, as quais são capazes de eliminar bactérias patogênicas como *Helicobacter pylori* (PANDEY et al., 2013; PETERNEL et al., 2010; ROGELJ e MATIJAŠIĆ, 2006). Adicionalmente, o ácido láctico, produto final do metabolismo dessa bactéria, também atua eliminando bactérias, uma vez que reduz o pH do meio, e aumenta o peristaltismo, dificultando a adesão das bactérias patogênicas ao epitélio intestinal (LIU et al., 2006).

O consumo contínuo de *L. gasseri* tem sido relacionado à melhora da função da barreira intestinal e a redução da concentração sérica de LPS (KAWANO et al., 2016). Para tanto, o consumo contínuo de *L. gasseri* ($1,06 \times 10^9$ UFC/g de dieta, durante 5 semanas) é capaz de aumentar a produção de imunoglobulina A e a população de células imunoglobulina A positivas presentes nas placas de Peyer (SAKAI et al., 2014). Quanto às proteínas de junção celular aparentemente *L. gasseri* não é capaz de aumentar a expressão das mesmas, contudo, é provável que

essa bactéria atue melhorando a distribuição dessas proteínas, de modo a reduzir a permeabilidade intestinal (KAWANO et al., 2016). Como consequência do efeito modulatório dessa bactéria, observa-se que a concentração de substâncias produzidas por microrganismos que podem comprometer o funcionamento da barreira intestinal, tais como p-cresol, é reduzida (FUJIWARA et al., 2001). Ainda, durante a fase estacionária de seu crescimento, *L. gasseri* produz uma proteína termoestável de baixo peso molecular (< 3 kDa) (DI LUCCIA et al., 2013), a qual protege as células epiteliais intestinais da apoptose induzida pelas citocinas pró-inflamatórias, auxiliando na manutenção da barreira intestinal (DI LUCCIA et al., 2013; KAWANO et al., 2016).

Como consequência da melhora da barreira intestinal tem sido observado que o consumo contínuo de *L. gasseri* reduz a inflamação sistêmica, intestinal e do tecido adiposo. Essa bactéria seria capaz de reduzir a inflamação intestinal, por meio da modulação da resposta imune inata local (CARROLL et al., 2007; LUONGO et al., 2013; SHI et al., 2013; YODA et al., 2012; YOSHIDA et al., 2011). Ainda, algumas estirpes de *L. gasseri* são capazes de eliminar os radicais livres presentes no lúmen intestinal, que foram gerados por outras bactérias ali presentes ou pelo sistema imune local, uma vez que possuem em sua superfície enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (CARROLL et al., 2007; KIM et al., 2006).

Quanto à inflamação do tecido adiposo, já foi constatado que o tecido adiposo de indivíduos com excesso de peso tratados com *L. gasseri* apresentou um maior número de macrófagos M2 e um menor número de macrófagos M1 e linfócitos CD8 em comparação com o controle. Considerando que os macrófagos M2 possuem atividade anti-inflamatória enquanto M1 é pró-inflamatório, tal resultado sugere que o consumo dessa bactéria é capaz de reduzir a inflamação no tecido adiposo (KAWANO et al., 2016; UKIBE, MIYOSHI e KADOOKA, 2015). Adicionalmente, o tecido adiposo de indivíduos com excesso de peso tratados com *L. gasseri* apresentaram menor expressão de genes pró-inflamatórios tais como *MCP1*, *PAI1*, *CCR2* e *TNF α* , além de uma maior expressão de adiponectina, que é anti-inflamatória (MIYOSHI et al., 2014; UKIBE et al., 2015; YONEJIMA et al., 2013).

Outro mecanismo que seria utilizado por *L. gasseri*, diz respeito à modulação do metabolismo de seu hospedeiro, nesse sentido já foi constatado que o consumo contínuo desse probiótico pode reduzir a atividade da enzima LPL no tecido adiposo

(HAMAD et al., 2009), aumentar a expressão de genes relacionados com o processo de lipólise no tecido adiposo e no fígado (KANG et al., 2013; MIYOSHI et al., 2014; YONEJIMA et al., 2013), e aumentar a expressão do Fiaf (KANG et al., 2013). Apesar de, até o momento, o mecanismo molecular que proporciona essa modulação não ter sido esclarecido, sabe-se que o consumo contínuo de *L. gasseri* leva ao aumento da concentração dos AGCC nas fezes e esses são capazes de modular o metabolismo energético do hospedeiro (SAWADA et al., 2016; SHIROUCHI et al., 2016). Ainda, recentemente foi observado que ratos Sprague-Dawley tratados com leite desnatado fermentado produzido por *L. gasseri* SBT2055 (6×10^7 UFC/g de dieta) durante 4 semanas, apresentaram uma maior taxa de oxidação de carboidratos durante o período noturno em comparação com o controle, com isso o gasto energético total do grupo tratado foi maior, o que levou a um menor ganho de massa corporal (SHIROUCHI et al., 2016).

Destaca-se que os efeitos benéficos proporcionados pelo consumo de *L. gasseri* ocorrem, principalmente, quando a bactéria é consumida de forma contínua, uma vez que essa modula a composição da microbiota transiente, a qual é aos poucos eliminada juntamente com as fezes (KADOOKA et al., 2013). Assim, recomenda-se que *L. gasseri* seja consumido continuamente e em quantidades adequadas para que sua população seja mantida constante na microbiota intestinal.

Tabela 4 - Principais resultados dos estudos experimentais que avaliaram o efeito do tratamento com *L. gassari* sobre o excesso de peso e alterações metabólicas secundárias.

Modelo Animal e Dieta	Tratamento	Efeito (tratamento vs controle)	Mecanismo	Referência
Camundongos C57BL/6J machos com 7 semanas de vida Dieta AIN76 modificada rica em gorduras (40%)	<i>L. gassari</i> SBT2055 foi misturado a dieta na proporção de 0,5% ($1,4 \times 10^9$ UFC/g) 21 semanas	↓ ganho de massa e massa de gordura corporal	↓ inflamação no TA e a permeabilidade intestinal	Kawano et al.(2016)
Camundongos C57BL/6J machos com 7 semanas de vida Dieta <i>high-fat</i> com 45% de gorduras	<i>L. gassari</i> SBT2055 foi misturado a dieta na proporção de 1% (1×10^9 UFC/g) 12 semanas	↓ glicemia Não alterou massa e massa de gordura corporal	↓ inflamação no TA	Ukibe et al. (2015)
Camundongos C57BL/6J machos com 7 semanas de vida Dieta AIN76 modificada rica em gorduras (10%)	<i>L. gassari</i> SBT2055 foi misturado a dieta na proporção de 0,5% (5×10^8 UFC/g) 24 semanas	↓ ganho de massa, massa de gordura corporal e a gordura hepática	↓ inflamação no TA ↑ lipólise hepática	Miyoshi et al. (2014)
Camundongos C57BL/6J machos com 6 semanas de vida Dieta AIN76 modificada rica em sacarose	<i>L. gassari</i> BNR17 foi administrado via gavagem nas doses de 10^9 ou 10^{10} UFC duas vezes ao dia 10 semanas	↓ ganho de massa, massa de gordura corporal e o tamanho de adipócitos Não alterou glicemia	↓ inflamação no TA ↑ lipólise hepática ↓ leptina sérica	Kang et al. (2013)
Ratos Sprague-Dawley machos com 7 semanas de vida Dieta <i>high-fat</i> com 47,2% de gordura	<i>L. gassari</i> TMC0356 inativado pelo calor foi administrado via gavagem em baixa (41,8 mg/kg/d), média (83,5 mg/kg/d) e alta dose (167, 0 mg/kg/d) 15 semanas	↓ massa corporal, e glicemia	↓ inflamação sistêmica ↓ insulinemia	Shi et al. (2013)

Modelo Animal e Dieta	Tratamento	Efeito (tratamento vs controle)	Mecanismo	Referência
Camundongos KK-A ^y Dieta <i>high-fat</i> com 45% de gordura	<i>L. gasseri</i> NT foi misturado a dieta (10 ⁹ UFC/g) 5 semanas	↓ gordura visceral e hepática, e glicemia	↓ inflamação no TA ↑ lipólise hepática ↑ excreção fecal de sais biliares e de TG	Yonejima et al. (2013)
Ratos Sprague-Dawley machos com 6 semanas de vida Dieta AIN76 modificada rica em sacarose	<i>L. gasseri</i> BNR17 foi administrado via gavagem na dose 10 ⁹ UFC/0,5 mL duas vezes ao dia 12 semanas	↓ ganho de massa e gordura corporal, e glicemia	Modulação da composição da microbiota intestinal	Kang et al. (2010)
Ratos Zucker machos com 5 semanas de vida. Dieta AIN76	Leite fermentado produzido por <i>L. gasseri</i> SBT2055 foi misturado a dieta (6 × 10 ⁷ UFC/g) 4 semanas	↓ TA mesentérico e subcutâneo, tamanho dos adipócitos, e a concentração hepática de lipídios e colesterol Não alterou massa corporal e glicemia	↓ atividade da LPL e a absorção intestinal de lipídios ↑ excreção fecal de colesterol	Hamad et al. (2009)
Camundongos C57BL/KS/J <i>db/db</i> machos com 6 semanas de vida Dieta comercial padrão	<i>L. gasseri</i> BNR17 administrado via gavagem nas doses de 10 ⁷ , 10 ⁸ , 10 ⁹ e 10 ¹⁰ UFC/0,3 mL duas vezes ao dia 12 semanas	↓ glicemia de jejum e pós-prandial, HbA1c Não alterou massa corporal	↑ tolerância a glicose	Yun et al. (2009)
Ratos Sprague-Dawley machos com 4 semanas de vida. Dieta AIN76	Leite fermentado produzido por <i>L. gasseri</i> SBT2055 foi misturado a dieta (6 × 10 ⁷ UFC/g) 4 semanas	↓ concentração de TG no fígado e o tamanho dos adipócitos Não alterou massa e gordura corporal, e glicemia	↓ concentração sérica de leptina	Sato et al. (2008)

Fonte: elaborada pelo autor. Abreviações e símbolos: HbA1c: hemoglobina glicada; *L.*: *Lactobacillus*; LPL: lipase lipoproteica; TA: tecido adiposo; Tg: triglicerídeos; UFC: unidades formadoras de colônias, ↑: aumentou, ↓: reduziu.

Tabela 5 - Principais resultados dos estudos clínicos que avaliaram o efeito do tratamento com *L. gassari* sobre o excesso de peso e alterações metabólicas secundárias.

Participantes do estudo	Desenho do estudo	Intervenção	Principais Resultados	Referência
62 Coreanos adultos obesos de ambos os sexos	Randomizado, duplo-cego, controlado com placebo	6 capsulas/dia (2 capsulas 30 min antes das refeições) contendo 10^{10} UFC de <i>L. gassari</i> BNR17 cada 12 semanas	<i>Baseline vs Final</i> ↓ massa corporal e a circunferência da cintura <i>Tratado vs Controle</i> Não alterou a massa corporal, percentual de gordura corporal, circunferência da cintura e o perfil lipídico sérico	Jung et al. (2013)
210 Japoneses adultos obesos de ambos os sexos pareados por idade, sexo e IMC	Randomizado, multicêntrico, paralelo, controlado com placebo	200 g/dia de leite fermentado com culturas <i>starters</i> e adicionado de 10^7 ou 10^6 UFC de <i>L. gassari</i> SBT2055/100g 12 semanas	<i>Doses alta vs baixa</i> Não houve diferença <i>Tratado vs Controle</i> ↓ gordura abdominal, IMC e circunferência da cintura	Kadooka et al. (2013)
87 Japoneses adultos obesos de ambos os sexos pareados por idade, sexo e IMC	Randomizado, multicêntrico, duplo-cego, controlado com placebo	200 g/dia de leite fermentado com culturas <i>starters</i> e adicionado de 5×10^{10} UFC de <i>L. gassari</i> SBT2055/100g 12 semanas	<i>Tratado vs Controle</i> ↓ gordura visceral, subcutânea e total, massa corporal e circunferência da cintura	Kadooka et al. (2010)

Fonte: elaborada pelo autor. Abreviações e símbolos: IMC: índice de massa corporal; *L.*: *Lactobacillus*; UFC: unidades formadoras de colônias, ↓: reduziu.

3.4 Modelo Animal

A fim de melhor compreender como os fatores de risco contribuem para o desenvolvimento do excesso de peso, bem como investigar possíveis formas de prevenção e tratamento, pesquisadores utilizam-se cada vez mais de modelos animais obtidos a partir da indução por dieta *high-fat*, uma vez que esse modelo reproduz com maior fidedignidade o excesso de peso humano quando comparado aos modelos obtidos a partir de manipulação genética (WHITE et al., 2013).

Os animais comumente utilizados para o estudo do excesso de peso por meio da indução com dieta são os camundongos, sendo as linhagens isogênicas ou *inbred* (C57BL/6, C57BL/6J, AKR/J e A/J) as mais utilizadas (WHITE et al., 2013). Os protocolos empregados para a indução do excesso de peso são variados tanto com relação ao percentual de calorias provenientes dos lipídios da dieta (45 a 72%) quanto ao tempo de indução (8 a 12 semanas) (CANI et al., 2008; HWANG et al., 2015; MEMBREZ et al., 2008; MURPHY et al., 2012; RUNE et al., 2013). Ainda, quanto ao tipo de lipídio utilizado, recomenda-se a utilização da banha de porco, em função de sua alta concentração de ácidos graxos saturados, os quais promovem de forma mais eficiente um aumento da lipogênese e depósito de microvesículas de gordura no fígado, contribuindo tanto para o desenvolvimento da obesidade quanto da RI (WHITE et al., 2013).

Por apresentar um grande potencial saciogênico, usualmente os animais não consomem grandes quantidades de dieta *high-fat*, contudo, a quantidade consumida, em função de seu alto aporte calórico e seu perfil de ácidos graxos, é capaz de aumentar a massa e a gordura corporal de forma eficiente (CANI et al., 2008; DANIEL et al., 2013; UKIBE et al., 2015; WHITE et al., 2013).

Considerando a capacidade que a dieta possui de modular a composição da microbiota intestinal, sabe-se que o consumo contínuo da dieta *high-fat* é capaz de modificar a composição dessa microbiota e isso contribuiria para o desenvolvimento do excesso de peso no modelo animal (CANI et al., 2008; DANIEL et al., 2013; HILDEBRANDT et al., 2009).

Juntamente com a modulação na composição da microbiota observa-se que a fisiologia intestinal é alterada, uma vez que os metabólitos produzidos pela microbiota atuarão modulando a fisiologia local e conseqüentemente o risco para o desenvolvimento do excesso de peso (DANIEL et al., 2013). Assim, o consumo

da dieta *high-fat* leva ao aumento da permeabilidade intestinal, o que consequentemente aumenta o LPS sérico. Ainda, o LPS pode ser transportado pelas partículas de quilomícrons (CANI et al., 2007), com isso a dieta *high-fat* contribui para que o quadro de inflamação crônica de baixo grau se instale e consequentemente o excesso de peso se desenvolva.

A fim de potencializar os efeitos da dieta *high-fat* na indução do excesso de peso, tem sido administrada simultaneamente à dieta, uma solução de frutose na água de beber dos animais (KULKARNI et al., 2015; VEDOVA et al., 2016; VOLYNETS et al., 2017). Essa capacidade da frutose de aumentar o risco para o desenvolvimento do excesso de peso reside, principalmente, no potencial lipogênico que esse monossacarídeo possui. O consumo de grandes quantidades de frutose de forma contínuo aumentaria os estoques de gordura dos tecidos adiposo, muscular e hepático (DEKKER et al., 2010).

Adicionalmente, já foi observado que o consumo da dieta *high-fat* associado a frutose levaria a alterações na barreira intestinal, o que culminaria no aumento da permeabilidade intestinal. Ainda, tal padrão alimentar provocaria o aumento da população de Firmicutes em detrimento dos Bacteroidetes, e reduções nas populações de bactérias dos gêneros *Bifidobacterium* (VOLYNETS et al., 2017).

3.5 Referências Bibliográficas

Sociedade Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica
Diretrizes brasileiras de obesidade 2016 / ABESO - **Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica**. – 4.ed. - São Paulo, SP.

ALLAM, A. et al. Microspectrofluorimetry to dissect the permeation of ceftazidime in Gram-negative bacteria. **Scientific Reports**, v. 7, n. 986, p. 1-11, 2017.

BACKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 44, p. 15718-15723, 2004.

BACKHED, F. et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 3, p. 979-984, 2007.

BARZ, M. L. et al. Probiotics as complementary treatment for metabolic disorders. **Diabetes & Metabolism Journal**, v. 39, p. 291-303, 2015.

BECH-NIELSEN, G. V. et al. Manipulation of the gut microbiota in C57BL/6 mice changes glucose tolerance without affecting weight development and gut mucosal immunity. **Research in Veterinary Science**, v. 92, p. 501–508, 2012.

BOULANGÉ, C. L. et al. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. **Genome Medicine**, v. 8, n. 42, p. 1-12, 2016.

CANI, P. D. et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, p. 1761–1772, 2007.

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

CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, p. 737-743, 2009.

CANI, P. D.; HUL, M. V. Novel opportunities for next-generation probiotics targeting metabolic syndrome. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 32, p. 21-27, 2015.

CARROLL, I. M. et al. Anti-inflammatory properties of *Lactobacillus gasseri* expressing manganese superoxide dismutase using the interleukin 10-deficient mouse model of colitis. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology** v. 293, p. 729-738, 2007.

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

CHOU, C. J.; MEMBREZ, M.; BLANCHER, F. Gut decontamination with norfloxacin and ampicillin enhances insulin sensitivity in mice. **Nestle Nutrition Workshop Series Pediatric Program**, v. 62, p. 127–140, 2008.

COLLADO, M. C. et al. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, p. 894-899, 2008.

CONTERNO, L. et al. Obesity and the gut microbiota: does up-regulating colonic fermentation protect against obesity and metabolic disease? **Genes on Nutrition**, v. 6, p. 241–260, 2011.

DANIEL, H. et al. High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, p. 1-14, 2013.

DEKKER, M. J. et al. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism** v. 299, p. 685-694, 2010.

DEL FIOL, F. D. S. et al. Obesity and the use of antibiotics and probiotics in rats. **Chemotherapy**, v. 60, p. 162-167, 2014.

DI LUCCIA, B. et al. Rescue of fructose-induced metabolic syndrome by antibiotics or faecal transplantation in a rat model of obesity. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1-19, 2015.

DI LUCCIA, B. et al. *Lactobacillus gasseri* SF1183 affects intestinal epithelial cell survival and growth. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1-8, 2013.

DUNCAN, S. H. et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. **International Journal of Obesity**, v. 32, p. 1720-1724, 2008.

EVERARD, A. et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 22, p. 9066-9071, 2013.

FALONY, G. et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. **Science**, v. 352, n. 6285, p. 560-564, 2016.

FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2001.

FUJIWARA, S. et al. Establishment of orally-administered *Lactobacillus gasseri* SBT2055SR in the gastrointestinal tract of humans and its influence on intestinal microflora and metabolism. **Journal of Applied Microbiology** v. 90, p. 343-352, 2001.

GHOSH, S. S. et al. Oral supplementation with non-absorbable antibiotics or curcumin attenuates western diet-induced atherosclerosis and glucose intolerance in LDLR^{-/-} mice: Role of intestinal permeability and macrophage activation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1-9, 2014.

HAMAD, E. M. et al. Milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 influences adipocyte size via inhibition of dietary fat absorption in Zucker rats. **British Journal of Nutrition** v. 101, p. 716-724, 2009.

HILDEBRANDT, M. A. et al. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. **Gastroenterology**, v. 137, p. 1716-1724, 2009.

HOOPER, L. V. et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. **Science**, v. 291, n. 5505, p. 881-884, 2001.

HWANG, I. et al. Alteration of gut microbiota by vancomycin and bacitracin improves insulin resistance via glucagon-like peptide 1 in diet-induced obesity. **The FASEB Journal** v. 29, p. 1-15, 2015.

IANIRO, G.; TILG, H.; GASBARRINI, A. Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: between good and evil. **Gut**, v. 65, p. 1906-1915, 2016.

JENA, P. K. et al. Impact of targeted specific antibiotic delivery for gut microbiota modulation on high-fructose-fed rats. **Applied Biochemistry & Biotechnology**, p. 1-17, 2013.

JUMPERTZ, R. et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, p. 58-65, 2011.

JUNG, S.-P. et al. Effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on overweight and obese adults: A randomized, double-blind clinical trial. **Korean Journal of Family Medicine**, v. 34, p. 80-89, 2013.

KADOOKA, Y. et al. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 64, p. 636-643, 2010.

KADOOKA, Y. et al. Effect of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in fermented milk on abdominal adiposity in adults in a randomised controlled trial. **British Journal of Nutrition**, v. 110, p. 1696-1703, 2013.

KAHOULI, I.; TOMARO-DUCHESNEAU, C.; PRAKASH, S. Probiotics in colorectal cancer (CRC) with emphasis on mechanisms of action and current perspectives. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 1107–1123, 2013.

KANG, J.-H.; YUN, S.-I.; PARK, H.-O. Effects of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on body weight and adipose tissue mass in diet-induced overweight rats. **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 712-714, 2010.

KANG, J.-H. et al. Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 in high-sucrose diet-induced obese mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2013.

KAWANO, M. et al. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 inhibits adipose tissue inflammation and intestinal permeability in mice fed a high-fat diet. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, n. 23, p. 1-9, 2016.

KAWASE, M. et al. Strain-specific detection by pulsed-field gel electrophoresis of *Lactobacillus gasseri* TMC0356 in human feces after oral administration of these organisms. **Microbiology and Immunology**, v. 55, p. 589-594, 2011.

KIM, H. S. et al. Antioxidative and probiotic properties of *Lactobacillus gasseri* NLRI-312 isolated from Korean infant feces. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 19, n. 9, p. 1335-1341, 2006.

KOBYLIAK, N.; VIRCHENKO, O.; FALALYEYEVA, T. Pathophysiological role of host microbiota in the development of obesity. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 43, p. 1-12, 2016.

KULKARNI, N. M. et al. A novel animal model of metabolic syndrome with non-alcoholic fatty liver disease and skin inflammation. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 8, p. 1110-1117, 2015.

LEY, R. E. et al. Obesity alters gut microbial ecology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 11070-11075, 2005.

LEY, R. E.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**, v. 124, p. 837–848, 2006.

LEY, R. E. et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, p. 1022-1023, 2006.

LIU, J.-R. et al. The anti-allergenic properties of milk kefir and soymilk kefir and their beneficial effects on the intestinal microflora. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 2527–2533, 2006.

LUONGO, D. et al. Differential modulation of innate immunity *in vitro* by probiotic strains of *Lactobacillus gasseri*. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 298, p. 1-12, 2013.

MATHUR, R. et al. Metabolic effects of eradicating breath methane using antibiotics in prediabetic subjects with obesity. **Obesity**, v. 24, p. 576–582, 2016.

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

MIKKELSEN, K. H. et al. Effect of antibiotics on gut microbiota, gut hormones and glucose metabolism. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1-14, 2015.

MILLION, M.; RAOULT, D. Species and strain specificity of *Lactobacillus* probiotics effect on weight regulation. **Microbial Pathogenesis**, v. 55, p. 52-54, 2013.

MIYOSHI, M. et al. Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 accompanied by inhibition of pro-inflammatory gene expression in the visceral adipose tissue in diet-induced obese mice. **European Journal of Nutrition**, v. 53, p. 599-606, 2014.

MRESTANI, Y. et al. Influence of enhancers on the absorption and on the pharmacokinetics of cefodizime using *in-vitro* and *in-vivo* models. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 485-493, 2004.

MUCCIOLI, G. G. et al. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. **Molecular Systems Biology**, v. 6, n. 392, p. 1-15, 2010.

MURPHY, E. F. et al. Divergent metabolic outcomes arising from targeted manipulation of the gut microbiota in diet-induced obesity. **Gut**, p. 1-8, 2012.

MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. Obesity, diabetes, and gut microbiota: The hygiene hypothesis expanded ? **Diabetes Care**, v. 33, p. 2277-2284, 2010.

OGAWA, A. et al. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 reduces postprandial and fasting serum non-esterified fatty acid levels in Japanese hypertriacylglycerolemic subjects. **Lipids in Health and Disease**, v. 13, n. 36, p. 1-8, 2014.

OGAWA, A. et al. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 suppresses fatty acid release through enlargement of fat emulsion size *in vitro* and promotes fecal fat excretion in healthy Japanese subjects. **Lipids in Health and Disease**, v. 14, n. 20, p. 1-10, 2015.

PANDEY, N. et al. Gassericin A: a circular bacteriocin produced by Lactic acid bacteria *Lactobacillus gasseri*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, p. 1-11, 2013.

PARK, S.; BAE, J.-H. Probiotics for weight loss: a systematic review and meta-analysis. **Nutrition Research**, v. 35, p. 566-575, 2015.

PETERNEL, M. Z. et al. Wide-inhibitory spectra bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* K7. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 2, p. 233-240, 2010.

PIDOT, S. J. et al. Antibiotics from neglected bacterial sources. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, p. 14-22, 2014.

PRADOS-BO, A. et al. El papel de los probióticos en el manejo de la obesidad. **Nutrición Hospitalaria**, v. 21, n. 1, p. 10-18, 2015.

RAJPAL, D. K. et al. Selective spectrum antibiotic modulation of the gut microbiome in obesity and diabetes rodent models. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1-19, 2015.

RAZMPOOSH, E. et al. Probiotics as beneficial agents in the management of diabetes mellitus: a systematic review. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 32, p. 143-168, 2016.

REIJNDERS, D. et al. Effects of gut microbiota manipulation by antibiotics on host metabolism in obese humans: A randomized double-blind placebo-controlled trial. **Cell Metabolism**, v. 24, p. 63-74, 2016.

RITTER, P.; KOHLER, C.; VON AH, U. Evaluation of the passage of *Lactobacillus gasseri* K7 and bifidobacteria from the stomach to intestines using a single reactor model. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 87, p. 1-9, 2009.

ROGELJ, I.; MATIJAŠIĆ, B. B. *Lactobacillus gasseri* LF221 and K7: from isolation to application. **Institute of Molecular Biology - Slovak Academy of Sciences**, v. 61, n. 6, p. 761-769, 2006.

ROSÁRIA, N. A.; GRUMACH, A. S. Alergia a beta-lactâmicos na prática pediátrica: uma abordagem prática. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n.5, p. 181-188, 2006.

RUNE, I. et al. Ampicillin-improved glucose tolerance in diet-induced obese C57BL/6NTac mice is age dependent. **Journal of Diabetes Research**, p. 1-13, 2013.

SAAD, M. J. A.; SANTOS, A.; PRADA, P. O. Linking gut microbiota and inflammation to obesity and insulin resistance. **Physiology**, v. 31, p. 283-293, 2016.

SAKAI, F. et al. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 induces TGF- β expression in dendritic cells and activates TLR2 signal to produce IgA in the small intestine. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 1-11, 2014.

SAMUEL, B. S. et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. **PNAS** v. 205, n. 43, p. 16767–16772, 2008.

SATO, M. et al. Effects of milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 on adipocyte size in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 99, p. 1013-1017, 2008.

SAWADA, D. et al. Effect of continuous ingestion of a beverage prepared with *Lactobacillus gasseri* CP2305 inactivated by heat treatment on the regulation of intestinal function. **Food Research International**, v. 79, p. 33-39, 2016.

SCHWIERTZ, A. et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. **Obesity (Silver Spring)**, v. 18, p. 190-195, 2010.

SHI, L. et al. Effects of heat-inactivated *Lactobacillus gasseri* TMC0356 on metabolic characteristics and immunity of rats with the metabolic syndrome. **British Journal of Nutrition**, v. 109, p. 263-272, 2013.

SHIROUCHI, B. et al. Probiotic *Lactobacillus gasseri* SBT2055 improves glucose tolerance and reduces body weight gain in rats by stimulating energy expenditure. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 3, p. 451-458, 2016.

SIRISINHA, S. The potential impact of gut microbiota on your health: Current status and future challenges. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 34, p. 249-264, 2016.

SOMMER, F.; BÄCKHED, F. The gut microbiota - Masters of host development and physiology. **Nature Reviews**, v. 11, p. 227-238, 2013.

STAPPENBECK, T. S.; HOOPER, L. V.; GORD, J. I. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 24, p. 15451-15455, 2002.

TJALSMA, H. et al. A bacterial driver–passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. **Nature Reviews: Microbiology**, v. 10, p. 575-582, 2012.

TURNBAUGH, P. J. et al. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. **Cell Host Microbe**, v. 3, p. 213-223, 2008.

TURNBAUGH, P. J. et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature Letters**, v. 457, p. 480-485, 2009.

UKIBE, K.; MIYOSHI, M.; KADOOKA, Y. Administration of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 suppresses macrophage infiltration into adipose tissue in diet-induced obese mice. **British Journal of Nutrition**, v. 114, p. 1180-1187, 2015.

USMAN; HOSONO, A. Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 243-248, 1999.

VEDOVA, M. C. D. et al. A mouse model of diet-induced obesity resembling most features of human metabolic syndrome. **Nutrition and Metabolic Insights**, v. 9, p. 93-102, 2016.

VOLYNETS, V. et al. Intestinal barrier function and the gut microbiome are differentially affected in mice fed a western-style diet or drinking water supplemented with fructose. **The Journal of Nutrition**, p. 1-11, 2017.

VRIEZE, A. et al. Impact of oral vancomycin on gut microbiota, bile acid metabolism, and insulin sensitivity. **Journal of Hepatology**, v. 60, p. 824–831, 2014.

WEŃGIELSKA, I.; SULIBURSKA, J. The role of intestinal microbiota in the pathogenesis of metabolic diseases. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 15, n. 2, p. 201-211, 2016.

WHITE, P. A. S. et al. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 57, n. 5, p. 339-345, 2013.

YODA, K. et al. Orally administered heat-killed *Lactobacillus gasseri* TMC0356 alters respiratory immune responses and intestinal microbiota of diet-induced obese mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113 p. 155-162, 2012.

YONEJIMA, Y.; USHIDA, K.; MORI, Y. *Lactobacillus gasseri* NT decreased visceral fat through enhancement of lipid excretion in feces of KK- A^y mice.

Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v. 77, n. 11, p. 2312-2315, 2013.

YOSHIDA, A. et al. *Lactobacillus gasseri* OLL 2809 and its RNA suppress proliferation of CD 4+ T cells through a MyD 88-dependent signalling pathway. **Immunology**, v. 133, p. 442-451, 2011.

YUN, S. I.; PARK, H. O.; KANG, J. H. Effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on blood glucose levels and body weight in a mouse model of type 2 diabetes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 1681-1686, 2009.

ZHANG, H. et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 2365-2370, 2009.

4 METODOLOGIA GERAL

4.1 Cálculo Amostral

O tamanho amostral foi calculado conforme proposto por Mera et al. (1998), adotando-se uma diferença de 10% no ganho de massa corporal (variável principal) em relação aos tratamentos e um poder estatístico de 99% ($\alpha \leq 0,01$). Para os cálculos utilizou-se os valores obtidos no estudo de Miyoshi et al. (2014). Assim, obteve-se o número de sete animais por grupo experimental (Apêndice A). Como serão utilizados cinco grupos experimentais foram utilizados trinta e cinco animais no experimento.

4.2 Modelo Animal

Foram utilizados trinta e cinco camundongos C57BL/6J machos provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com ciclo claro/escuro de 12h e temperatura média de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Durante todo o período experimental, os animais tiveram livre acesso a solução de frutose ou água, e as dietas experimentais, que foram administradas seguindo o esquema de *pair-feeding*.

Após passarem por quatro semanas de adaptação teve início o experimento, estando os animais com oito semanas de vida.

4.3 Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFV, número 09/2017 (Anexo A), e seguiu as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (BRASIL, 2008) e a Declaração de Helsinki.

4.4 Desenho Experimental

Inicialmente os camundongos passaram pela fase de indução do excesso de peso que tinha como objetivo produzir uma diferença de massa corporal entre os animais. Para tanto os camundongos foram divididos aleatoriamente em dois grupos (Figura 2) sendo grupo *high-fat* ($n = 28$) e controle negativo ($n = 7$). O grupo *high-fat* foi alimentado com dieta *high-fat* com 60% das calorias provenientes de lipídios (MEMBREZ et al., 2008) e uma solução de frutose

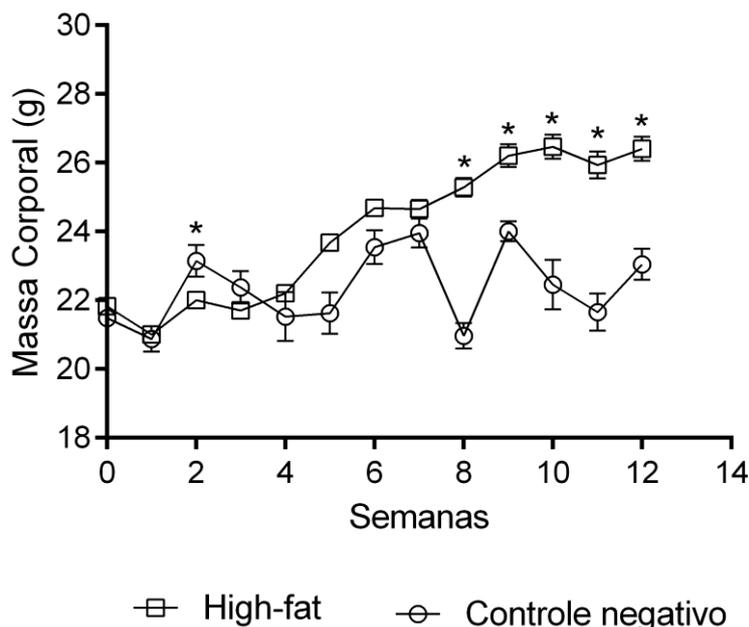
(Synth[®], Diadema, Brasil) a 10% no lugar da água de beber (VEDOVA et al., 2016). Já o grupo controle negativo foi alimentado com dieta AIN93M (REEVES, NIELSEN e FAHEY, 1993) (Tabela 6) e água destilada.

Tabela 6 - Composição centesimal das dietas experimentais.

Ingredientes	High-fat 60%	AIN-93M
Banha de porco (g)	31,70	-
Caseína (> 85 % de proteína) (g)	25,80	14,00
Maltodextrina (g)	16,20	15,50
Sacarose (g)	8,90	10,00
Celulose (g)	6,50	5,00
Óleo de soja (g)	3,20	4,00
Citrato de potássio (g)	2,10	-
Fosfato de cálcio (g)	1,70	-
Mix mineral (g)	1,30	3,50
Mix vitamínico (g)	1,30	1,00
Carbonato de cálcio (g)	0,70	-
L-cistina (g)	0,39	0,18
Bitartarato de colina (g)	0,30	0,25
Calorias das gorduras (%)	60,67	10,00
Calorias dos carboidratos (%)	19,39	75,90
Calorias das proteínas (%)	19,93	14,10
Densidade calórica (kcal/g)	5,17	3,80

Fonte: Research diets (<http://www.researchdiets.com/open-source-diets/stock-diets/dio-series-diets>) e Reeves et al. (1993).

Os animais foram pesados semanalmente, sendo a diferença estatística ($p < 0,05$) de massa corporal entre os grupos utilizada como critério para o início da fase de tratamento (Gráfico 1).

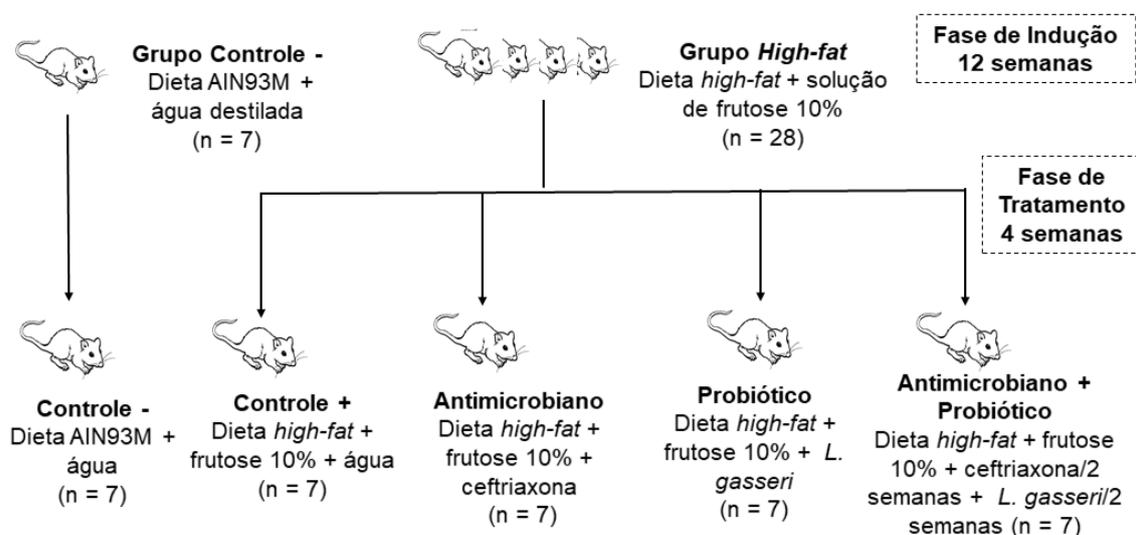
Gráfico 1 - Massa corporal da fase de indução.

Fonte: elaborada pelo autor. Os valores são expressos como média \pm EP. * indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos, segundo teste de *t* de *student*.

Assim após 12 semanas, teve início a fase de tratamento na qual os camundongos do grupo *high-fat* ($n = 28$) foram divididos aleatoriamente em quatro grupos cada um com sete animais, sendo: controle positivo, probiótico, antimicrobiano e antimicrobiano mais probiótico (antimicrobiano+probiótico) (Figura 2). Essa fase teve duração de quatro semanas. A escolha do tempo de tratamento baseou-se na falta de consenso sobre quanto tempo um antimicrobiano pode ser utilizado no tratamento adjuvante do excesso do peso (REIS, PELUZIO e BRESSAN, 2018) e também no potencial risco de morte dos animais, já que a dose utilizada é considerada uma superdose.

Os animais continuaram a receber as mesmas dietas e a solução de frutose que lhes foram administradas na fase de indução, de acordo com o esquema de *pair-feeding*, e todos os tratamentos foram administrados diariamente via gavagem.

Figura 2 - Desenho experimental completo.



Fonte: elaborada pelo autor. Inicialmente os camundongos C57BL/6J machos (n = 35) passaram pela fase de indução que tinha como objetivo produzir uma diferença de massa corporal entre os animais. Para tanto os camundongos foram divididos randomicamente nos grupos *high-fat* (n = 28) e controle negativo (n = 7). O grupo *high-fat* foi alimentado com dieta *high-fat* com 60% das calorias provenientes de lipídios e uma solução de frutose a 10% no lugar da água de beber. Após ter sido constatado que as massas corporais desses dois grupos diferiam estatisticamente, teve início a fase de tratamento com duração total de 4 semanas. Para tanto, os camundongos foram subdivididos em 4 grupos experimentais, sendo controle positivo tratado com água; antimicrobiano tratado com ceftriaxona (500 mg/kg); probiótico tratado com *L. gasseri* (10⁹ UFC/dia); e antimicrobiano mais probiótico, que nas duas semanas iniciais foi tratado com ceftriaxona (500 mg/kg) e nas duas semanas subsequentes recebeu *L. gasseri* (10⁹ UFC/dia). Durante toda a fase de tratamento os animais continuaram recebendo as mesmas dietas da fase de indução e solução de frutose 10% em substituição à água de beber.

Os animais do grupo controle positivo foram tratados com 100 µL de água destilada. O grupo antimicrobiano foi tratado com 500 mg/kg (RAJPAL et al., 2015) de ceftriaxona (Triaxton®, Blau Farmacêutica S/A) diluídos em tampão fosfato salino (PBS), até o volume final de 100 µL. Esse antimicrobiano foi selecionado, pois atua, principalmente, contra as bactérias do tipo gram-negativas, as quais em função do LPS, têm sido relacionadas com o aumento do risco para o desenvolvimento do excesso de peso. Além disso a ceftriaxona não é absorvido pelo organismo, agindo localmente no intestino delgado e no cólon (AUDA et al., 2009; MRESTANI et al., 2004). A dose escolhida foi baseada no estudo de Rajpal et al. (2015) o qual obteve melhores resultados com relação ao excesso de peso ao tratar um modelo animal semelhante ao do presente estudo com 500 mg de ceftazidima (cefalosporina de terceira geração)/kg de massa corporal.

Já o grupo probiótico, recebeu 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) de *Lactobacillus gasseri* (Lemma Supply Solutions®, Brooklin Paulista, Brasil) diluídos em PBS, até o volume final de 100 μ L. Sendo, esse probiótico selecionado em função de seus efeitos positivos descritos na literatura científica sobre o excesso de peso e adiposidade corporal (KANG et al., 2013; KAWANO et al., 2016; MIYOSHI et al., 2014; SHI et al., 2013).

O grupo antimicrobiano+probiótico recebeu nas primeiras duas semanas da fase de tratamento 500 mg/kg (RAJPAL et al., 2015) de ceftriaxona (Triaxton®, Blau Farmacêutica S/A) diluídos em PBS, e nas duas semanas subsequentes 10^9 UFC de *L. gasseri* (Lemma Supply Solutions®, Brooklin Paulista, Brasil) diluídos em PBS até o volume final de 100 μ L. Com esse esquema de tratamento espera-se que o antimicrobiano elimine as bactérias relacionadas com o aumento do risco para o desenvolvimento do excesso de peso e o probiótico recolonize mais rapidamente esse ambiente, levando a uma redução no ganho de massa corporal (DEL FIOLE et al., 2014).

4.5 Massa e Medidas Corporais

A massa corporal dos animais foi verificada semanalmente por meio de pesagem em balança. A partir dos valores obtidos, calculou-se o ganho de massa corporal a partir da diferença entre a massa final e a inicial.

Com relação às medidas corporais, essas foram aferidas ao final da fase de tratamento. Para tanto, foram aferidos os perímetros abdominal (medido imediatamente antes das pernas traseiras - PA) e torácico (medido imediatamente após as pernas dianteiras - PT) com o auxílio de uma fita inelástica milimetrada. Assim, foi possível calcular a razão perímetro abdominal/perímetro torácico (DEL FIOLE et al., 2014).

O índice de Lee foi calculado a partir da divisão da raiz cúbica da massa corporal (g) pelo comprimento focinho ânus (cm). Esse índice assemelha-se ao IMC para humanos, porém não existem valores de referência para animais, sendo valores elevados considerados indicadores de adiposidade corporal aumentada (DEL FIOLE et al., 2014).

4.6 Consumo Alimentar, Hídrico e Calórico

O consumo alimentar foi avaliado a partir da diferença entre a quantidade de dieta ofertada e a quantidade não consumida. A solução de frutose a 10% ofertada e consumida durante todo o experimento também foi quantificada. O consumo calórico foi estimado com base na quantidade de dieta *high-fat* (5,177 kcal/g de dieta) e solução de frutose à 10% (4 kcal/g de frutose) consumidas.

4.7 Teste de Tolerância Oral à Glicose

O teste de tolerância oral à glicose (TTOG) foi realizado ao final da fase de tratamento. Para tanto, os camundongos permaneceram 12h em jejum e a solução de frutose a 10% foi substituída por água destilada.

As coletas foram realizadas a partir de um pequeno corte na extremidade da cauda do animal e a leitura foi realizada com o auxílio de tiras reagentes (Accu-Check® Active, Risch-Rotkreuz, Suíça). Após a primeira leitura (tempo 0), foi administrada aos animais via gavagem uma solução de glicose à 25% (2 g/kg de massa corporal) e amostras de sangue foram coletadas após 15, 30, 60 e 90 min. Com isso, foi possível calcular a AUC de glicose para cada animal (HWANG et al., 2015).

4.8 Permeabilidade Intestinal

O teste de permeabilidade intestinal foi realizado ao final da fase de tratamento, sendo os camundongos alocados em gaiolas metabólicas para que o teste pudesse ser realizado. Os animais receberam via gavagem 200 µL de uma solução contendo 13,3 mg de lactulose (Daiichi Sankyo, Barueri, Brasil), um marcador da permeabilidade transcelular, e 10,1 mg de manitol (Synth®, Diadema, Brasil), um marcador da permeabilidade paracelular, e toda a urina excretada nas 24h subsequentes foi coletada (JIN et al., 2008). Para estimular a produção de urina, os animais receberam duas gavagens (100 µL cada) de água durante o período de coleta. Posteriormente, a urina coletada foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min, para eliminar impurezas, sendo armazenada a -80°C em tubos plásticos do tipo *ependorf*.

A quantificação dos açúcares foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu®, detector modelo: RID 10A, Japão) utilizando comprimento de onda de 210 nm. Para a separação cromatográfica,

20 µL de amostra foram injetadas em uma coluna móvel (Aminex[®], modelo HPX-87H, EUA) com 300 mm x 7,8 mm de diâmetro com fluxo de 1 mL/min e pressão de 54 kgf utilizando como fase móvel água.

Os resultados foram apresentados em percentagem de excreção urinária dos açúcares e razão de lactulose/manitol.

4.9 Eutanásia e Extração do Material Biológico

A eutanásia dos animais foi realizada no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da UFV, por uma equipe treinada.

Foi utilizado anestésico inalatório, em função da necessidade de coleta de sangue. Assim, os camundongos foram anestesiados de 2 a 4 min com isoflurano a 3% (Cristália[®], Belo Horizonte, Brasil), utilizando circuito simples com fluxômetro, acoplado a um cilindro de oxigênio. Os animais foram condicionados individualmente em caixas transparentes que foram vedadas para saturação do anestésico, potencializando assim os efeitos da sedação e anestesia. Foram avaliados os parâmetros fisiológicos e reflexos para averiguação do grau de sensibilidade da anestesia para que, enfim, os animais fossem submetidos à exsanguinação total (BRASIL, 2008).

O sangue foi coletado por incisão na aorta abdominal em tubos de coleta sem heparina e foram posteriormente centrifugados a 3000 rpm por 10 min. As amostras de soro coletadas foram armazenadas a -80°C para análises posteriores.

O fígado foi removido, lavado com PBS e pesado. Posteriormente, o índice hepatossomático foi calculado a partir da massa desse órgão. Parte das amostras coletadas foram armazenadas a -80°C e fixadas em formalina de Carson (1973) para análises posteriores.

O tecido adiposo abdominal foi removido, lavado com PBS e pesado. Com base na massa desses tecidos calculou-se o somatório do tecido adiposo corporal. Uma amostra de tecido adiposo abdominal foi fixada em solução de formol cálcio 10%.

Amostras de intestino delgado (porção jejunal) foram lavadas com PBS, fixadas em formalina de Carson (1973) e armazenadas à -80°C para análises posteriores.

4.10 Análises Bioquímicas

O colesterol total, a lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol), os triglicerídios, a alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST) foram determinados nas amostras de soro, por meio de método enzimático colorimétrico, utilizando-se *kits* Bioclin[®]/Quibasa (Belo Horizonte, Brasil), seguindo os procedimentos descritos pelo fabricante. As leituras foram realizadas em analisador automático (BS200, Mindray Bio-Medical Electronics Co., Shenzhen, Hong Kong).

As concentrações da lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol) foi calculada de acordo com as equações propostas por Friedwald et al. (1972), sendo $LDL = \text{colesterol total} - HDL-c - (\text{triglicerídeos}/5)$.

4.11 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

A expressão gênica das enzimas hepáticas *sterol responsive element binding protein 1* (SREBP-1), acetilCoA carboxilase-1 e ácido graxo sintase; bem como a expressão intestinal do SGLT-1, do *tool-like receptor 4* (TLR4) e do MyD88 foi avaliada por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).

O RNAm foi extraído com Trizol (Invitrogen[®], EUA), segundo as recomendações do fabricante. A concentração e a pureza do material extraído foram avaliadas com o auxílio do equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Scientific[®], EUA), sendo considerados aptos para seguimento da análise as amostras que obtiveram razão 260/280 acima de 1,8.

Para a confecção do cDNA utilizou-se o *kit GoScriptTM Reverse Transcription System* (A5000, Promega[®], Brasil). Novamente a pureza foi avaliada, sendo considerados aptos para seguimento da análise as amostras com razão 260/280 acima de 1,6.

As sequências de *primers* utilizadas (Apêndice B) foram comparadas com o BLAST quanto a especificidade para o modelo animal. A programação das reações foi de 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 10 s e 60°C por 30 s, 95°C por 15 s, 55°C por 15 s, e 95°C por 15 s.

As análises foram realizadas em termociclador (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e as quantidades relativas de RNAm foram avaliadas de

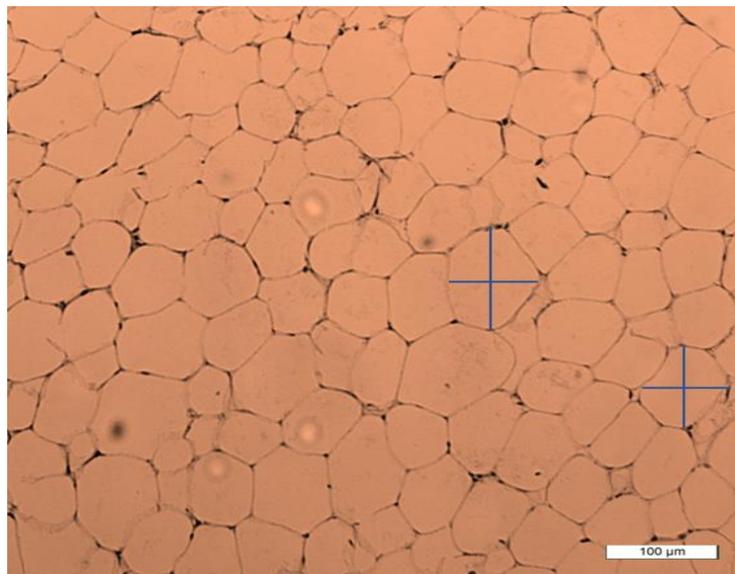
acordo com o método $\Delta\Delta\text{ct}$. Os resultados foram expressos em relação ao gene endógeno ribossomal protein L (RPL).

4.12 Histologia do Tecido Adiposo

Após fixação, amostras do tecido adiposo abdominal foram desidratadas em gradiente crescente de etanol (70% a absoluto) e incluídas em parafina. Posteriormente, fragmentos histológicos com 5 μm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo e corados com hematoxilina e eosina.

Para a contagem e aferição da área dos adipócitos, 10 campos/animal foram capturados com a objetiva de 10X diretamente do microscópio de luz (Zeiss 2012, Primo Star). Posteriormente, essas imagens foram analisadas com o auxílio do *software* Image Pro-Plus[®] versão 4.5 (Media Cybernetics, EUA). Foram contabilizadas todas as células que apresentaram contornos bem definidos e que estavam completas no campo da foto, e aferido o diâmetro de 20 células/campo, sendo o diâmetro de uma mesma célula aferido duas vezes em posições diferentes (Figura 3).

Figura 3 - Fotomicrografia do tecido adiposo abdominal.



Fonte: elaborada pelo autor. O traçado em azul representa a forma como o diâmetro dos adipócitos foi aferido. Coloração de hematoxilina e eosina. Aumento de 100X.

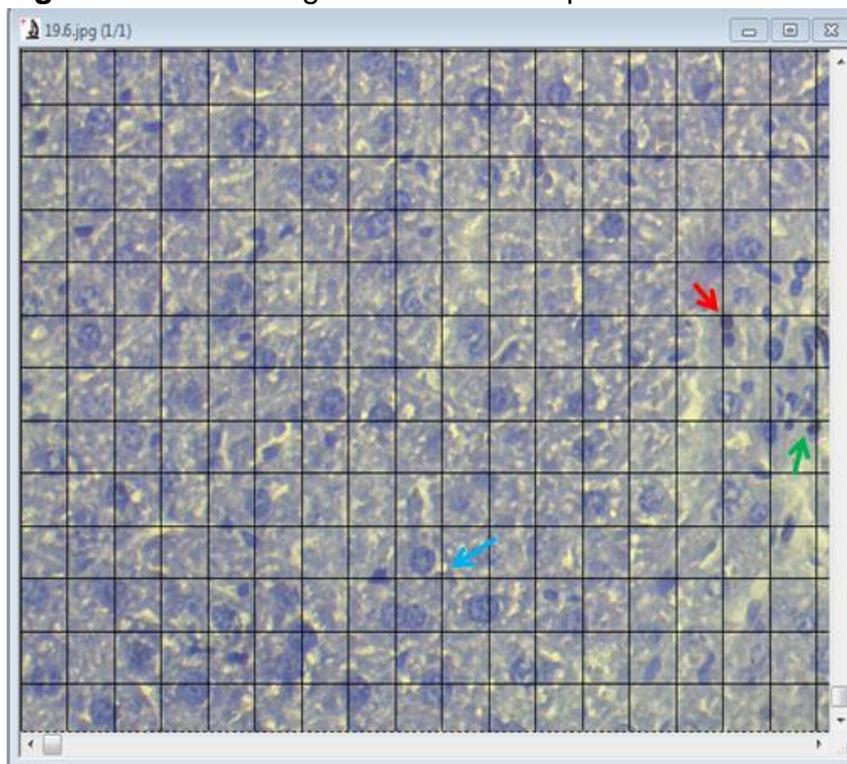
4.13 Histologia do Tecido Hepático

Após fixação, amostras do tecido hepático foram desidratadas em gradiente crescente de etanol (70% a absoluto) e incluídas em parafina. Posteriormente, fragmentos histológicos com 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo e corados com hematoxilina e eosina.

Para a obtenção das imagens foi feita uma varredura de todo o tecido sendo as imagens capturadas com a objetiva de 20X diretamente do microscópio de luz (Zeiss 2012, Primo Star). Posteriormente, essas imagens foram analisadas com o auxílio do *software* Image Pro-Plus® versão 4.5 (Media Cybernetics, EUA).

Para a contagem das gotículas de gordura e núcleo picnótico utilizou-se uma grade padrão (75 linhas x 75 colunas) nos campos fotografados, sendo contabilizadas apenas as gotículas e núcleos coincidentes com as interseções da grade. Já o infiltrado inflamatório foi contabilizado sempre que presente na imagem (Figura 4).

Figura 4 - Fotomicrografia do tecido hepático.



Fonte: elaborada pelo autor. Na ponta da seta vermelha encontra-se um hepatócito com núcleo picnótico que foi contabilizado. Na ponta da seta azul uma gotícula de gordura que não foi contabilizada e a seta verde indica a presença de um pequeno infiltrado inflamatório. Coloração de hematoxilina e eosina. Aumento de 200X. Imagem com um zoom aplicado pelo *software* Image Pro-Plus®.

4.14 Histologia do Intestino Delgado

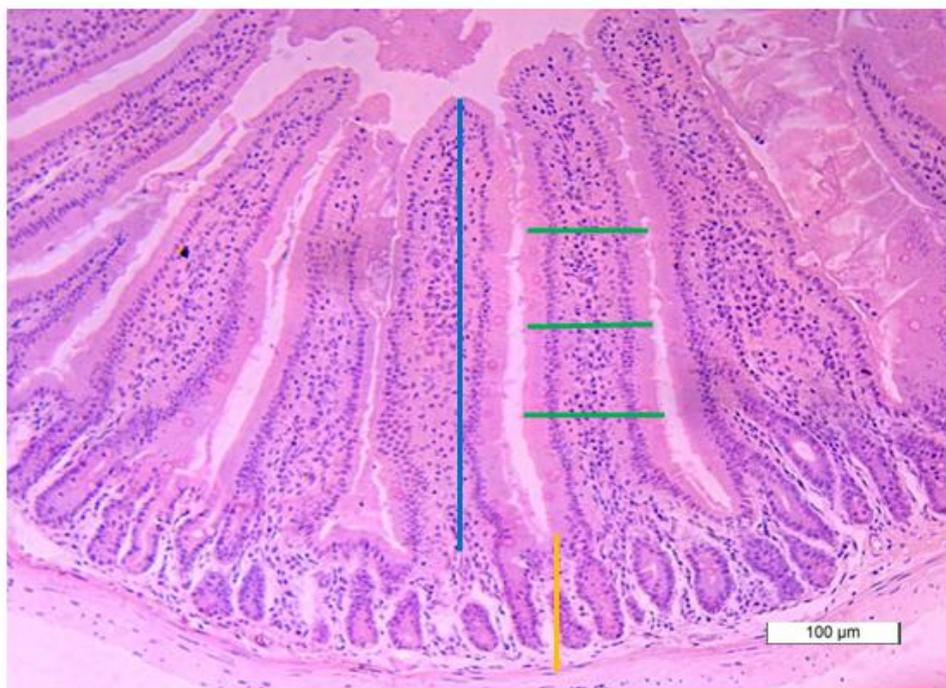
Após fixação, as amostras de intestino foram desidratadas em gradiente crescente de etanol (70% à absoluto) e incluídas em resina (Historesin® Leica), segundo as recomendações do fabricante. Posteriormente, fragmentos histológicos com 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo e corados com hematoxilina e eosina.

Para a análise morfométrica, imagens dos fragmentos histológicos foram capturados com a objetiva de 10X diretamente do microscópio de luz (Zeiss 2012, Primo Star, Alemanha). Com o auxílio do *software* Image Pro-Plus® versão 4.5 (Media Cybernetics, EUA) foram realizadas as seguintes medidas morfométricas (ROSA et al., 2010):

- *Altura das vilosidades*: foram selecionados 10 campos aleatórios/animal e apenas as vilosidades com epitélio bem definido e tecido conjuntivo visível foram aferidas (Figura 5);

- *Largura das vilosidades*: foram selecionados 10 campos aleatórios/animal sendo que na mesma vilosidade foram realizadas 3 medidas (apical, medial e basal), considerando-se o valor médio como resultado (Figura 5);
- *Profundidade das criptas*: foram aferidos 10 campos/animal, nas imagens onde era possível ver a base e o ápice (abertura) da cripta (Figura 5).

Figura 5 - Fotomicrografia do intestino delgado.



Fonte: elaborada pelo autor. Morfometria intestinal. A linha azul representa a medida da altura da vilosidade, a verde a medida da largura e a amarela a profundidade da cripta. Aumento de 100X.

4.15 Análise Estatística

A normalidade das variáveis foi determinada de acordo com o teste de Kolmogorov-Smirnov.

As comparações entre os dois grupos da fase de indução foram realizadas com o teste *t* de *student* para dados paramétricos e Mann Whitney para os dados não paramétricos.

As comparações entre os grupos experimentais foram realizadas segundo análise de variância (ANOVA) seguida do teste *post hoc* de Tukey para dados paramétricos. Para os dados não paramétricos, foi aplicado o teste de Kruskal Wallis complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn's.

Foi considerado um $\alpha < 0,05$ como significativo e os resultados foram expressos como média \pm erro padrão ou mediana \pm intervalo interquartilico. O processamento e a análise estatística dos dados foram realizados utilizando o *software* SPSS, versão 20 para *Windows* (SPSS INC., EUA).

4.16 Referências Bibliográficas

AUDA, S. H. et al. Preparation, physicochemical characterization and biological evaluation of cefodizime metal ion complexes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, p. 753-758, 2009.

BRASIL. **Lei Nº 11794 de 8 de outubro de 2008**. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Brasília, DF, 2008.

CARSON, F. L.; MARTIN, J. H.; LYNN, J. A. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 59, p. 365-373, 1973.

DEL FIOLE, F. D. S. et al. Obesity and the use of antibiotics and probiotics in rats. **Chemotherapy**, v. 60, p. 162-167, 2014.

FRIEDWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of concentration of low density lipoproteins separated by three different methods. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 18, p. 499-502, 1972.

HWANG, I. et al. Alteration of gut microbiota by vancomycin and bacitracin improves insulin resistance via glucagon-like peptide 1 in diet-induced obesity. **The FASEB Journal** v. 29, p. 1-15, 2015.

JIN, W. et al. Increased intestinal inflammatory response and gut barrier dysfunction in Nrf2-deficient mice after traumatic brain injury. **Cytokine**, v. 44, p. 135-140, 2008.

KANG, J.-H. et al. Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 in high-sucrose diet-induced obese mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2013.

KAWANO, M. et al. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 inhibits adipose tissue inflammation and intestinal permeability in mice fed a high-fat diet. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, n. 23, p. 1-9, 2016.

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

MERA, R.; THOMPSON, H.; PRASADA, C. How to calculate sample size for an experiment: a case-based description. **Nutritional Neuroscience**, v. 1, n. 1, p. 87-91, 1998.

MIYOSHI, M. et al. Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 accompanied by inhibition of pro-inflammatory gene expression in the visceral adipose tissue in diet-induced obese mice. **European Journal of Nutrition**, v. 53, n. 2, p. 599-606, 2014.

MRESTANI, Y. et al. Influence of enhancers on the absorption and on the pharmacokinetics of cefodizime using *in-vitro* and *in-vivo* models. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 485-493, 2004.

RAJPAL, D. K. et al. Selective spectrum antibiotic modulation of the gut microbiome in obesity and diabetes rodent models. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1-19, 2015.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. E. J. AIN-93 - Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-51, 1993.

REIS, S. A. D.; PELUZIO, M. D. C. G.; BRESSAN, J. The use of antimicrobials as adjuvant therapy for the treatment of obesity and insulin resistance: Effects and associated mechanisms. **Diabetes Metabolism Research Reviews**, v. 34, n. 6, p. 1-8, 2018.

ROSA, D. D. et al. Flaxseed, olive and fish oil influence plasmatic lipids, lymphocyte migration and morphometry of the intestinal of Wistar rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 25, p. 275-280, 2010.

SHI, L. et al. Effects of heat-inactivated *Lactobacillus gasseri* TMC0356 on metabolic characteristics and immunity of rats with the metabolic syndrome. **British Journal of Nutrition**, v. 109, p. 263-272, 2013.

VEDOVA, M. C. D. et al. A mouse model of diet-induced obesity resembling most features of human metabolic syndrome. **Nutrition and Metabolic Insights**, v. 9, p. 93-102, 2016.

5 ARTIGO DE REVISÃO: ARTIGO I

Received: 19 November 2017 | Revised: 18 February 2018 | Accepted: 4 April 2018

DOI: 10.1002/dmrr.3014

REVIEW ARTICLE

WILEY

The use of antimicrobials as adjuvant therapy for the treatment of obesity and insulin resistance: Effects and associated mechanisms

Sandra Aparecida dos Reis  | Maria do Carmo Gouveia Peluzio | Josefina Bressan

Department of Nutrition and Health,
Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil

Correspondence

Josefina Bressan, Department of Nutrition and
Health, Universidade Federal de Viçosa,
Viçosa, MG 36570-900, Brazil.
Email: jbrm@ufv.br

Summary

The intestinal microbiota has come to be considered an additional risk factor for the development of metabolic diseases. Considering the potential role of antimicrobials as modulators of the intestinal microbiota, they have been investigated for use in the adjuvant treatment of obesity and insulin resistance (IR). In this regard, the present manuscript aimed to review the effect of regular use of antimicrobials on the treatment of obesity and/or IR, as well as its associated mechanisms. The regular use of antimicrobials does not seem to influence the body weight and adiposity of its consumer. Regarding IR, clinical trials did not observe positive effects, on the other hand, most of the experimental studies observed an increase in insulin sensitivity. The mechanisms used by antimicrobials that could lead to the improvement of insulin sensitivity are dependent on the modulation of the intestinal microbiota. This modulation would lead to a reduction in the stimulation of the immune system, as a consequence of improved intestinal barrier and/or the reduction of gram-negative bacteria in the microbiota. In addition, the secretion of glucagon-like peptide-1 would be modulated by metabolites produced by the intestinal microbiota, such as secondary bile acids and short-chain fatty acids. Based on the results obtained to date, more studies should be performed to elucidate the effect of these drugs on obesity and IR, as well as the mechanisms involved. In addition, the cost-benefit of the regular use of antimicrobials should be investigated, as this practice may lead to the development of antimicrobial-resistant microorganisms.

KEYWORDS

antibiotics, GLP-1, immune system, intestinal microbiota, metabolic disease

1 | INTRODUCTION

Microbiota is a term that originally refers to all commensal, symbiotic, and pathogenic microorganisms that inhabit on the body surfaces of organisms.¹ In this sense, the term intestinal microbiota refers to all bacteria, fungi, yeasts, archaea, viruses, and protozoa that inhabit the intestine.²

In healthy adults, the intestinal microbiota can comprise more than 100 trillion microorganisms, hosting 500 to 1000 different species, which are predominantly anaerobic bacteria.^{2,3} This enormous

microbial diversity is essential to human health because they produce a variety of compounds and perform metabolic activities, all of which are indispensable for the maintenance of homeostasis. As a result, the intestinal microbiota can be considered an additional organ in our body.²

In this way, when there is an imbalance in the composition of the intestinal microbiota, dysbiosis occurs. Dysbiosis strongly influences host susceptibility to chronic diseases, particularly those related to chronic low-grade inflammation, such as obesity and insulin resistance (IR).¹

In 2004, Bäckhed et al⁴ proved for the first time that the intestinal microbiota is capable of increasing the risk of developing obesity and IR. In their experiment, they observed that although the food intake of conventional mice was lower (29% lower) than germ-free C57BL/6J mice, the latter's body fat mass was 42% lower. Furthermore, the conventionalization of the germ-free mice with the intestinal microbiota harvested from the conventional mice led to a 57% increase in body fat mass and IR in a span of 2 weeks, despite a 7% reduction in food intake. Ever since, attempts have been made to identify microorganisms related to the increased risk of developing obesity and IR, as well as the mechanisms used by them.⁵⁻⁹

Considering the high global prevalence of obesity associated with IR, its high morbidity and mortality rates, and the economic impact of its treatment,¹⁰ there are a growing number of studies that focus on new adjuvant therapeutic strategies for the treatment of obesity and IR through the modulation of the intestinal microbiota. In this regard, the role of antimicrobials has been investigated because of their potential to change the composition of the intestinal microbiota in a short or long term.¹¹

Thus, the aim of this manuscript was to review the effect of regular use of antimicrobials on the adjuvant treatment of obesity and/or IR, as well as its associated mechanisms. For this purpose, a search was performed in the PubMed/Medline database using the following descriptors: antibiotics OR antimicrobials, AND obesity OR overweight OR weight gain OR weight loss OR diabetes OR insulin resistance OR insulin sensitivity OR glucose intolerance, AND intestinal microbiota. A filter was used to select studies carried out during the last 10 years (February 2007 to February 2017). Clinical trials and experimental studies with obese individuals and/or IR individuals, of both sexes, and fully published in English were included. Studies with pregnant women, infants, children, and newborns were excluded. Similarly, studies with individuals who suffer from inflammatory bowel disease, diarrhoea, or any type of infectious disease were excluded.

2 | ANTIMICROBIALS

Antimicrobials are artificial substances synthesized in the laboratory, whose main function is to inhibit the growth of specific microorganisms. Antibiotics perform the same function as antimicrobials, but they are produced from specific fungi or bacteria species. Because of the high demand for these drugs, antimicrobials are commonly used because they are easily produced on a large scale.¹²

Antimicrobials are being investigated for their possible use in the treatment of chronic non-infectious diseases, such as obesity and IR because of their potential modulatory effect on the composition of the intestinal microbiota. It is expected that the regular use of antimicrobials exert a "eubiotic effect." Consequently, bacteria related to the increased risk of developing obesity and IR would be eliminated and those related to the reduced risk of these diseases could proliferate and recolonize the intestinal environment.¹³

Over the last years, studies have attempted to identify a specific microorganism or group (core) of those that would be responsible for the development of obesity and/or IR.¹⁴ Some studies have suggested that a greater abundance of bacteria of the phylum Firmicutes

(gram positive) and a lower of Bacteroidetes (gram negatives) could be related to the increased risk of developing these diseases.⁵⁻⁹ However, other studies have suggested otherwise.¹⁵⁻¹⁷ Based on these findings, it is difficult to select an appropriate antimicrobial for the treatment of obesity and/or IR, since this drug acts more efficiently on bacteria of the gram-positive or gram-negative group. Thus, an antimicrobial should be selected according to a single bacteria group to be eliminated, and it is likely that within the gram-positive and gram-negative groups, there are bacteria involved in the increase and decrease of the risk for the development of obesity and IR, which makes it difficult to obtain the "eubiotic effect."

2.1 | Treatment of obesity and IR with antimicrobials

Regarding the effect of antimicrobial treatment on body weight and/or adiposity, most studies did not find changes in these parameters at the end of the treatment and/or in comparison with the placebo/control groups (Tables 1 and 2). To reduce body weight and/or adiposity, an energy deficit must occur; however, this does not seem to happen during the antimicrobial treatment, since some of the parameters that can influence energy metabolism were not modified, such as the quantity of energy harvested from the diet,^{18,30} substrate utilization,^{31,32} gastric emptying,^{30,32} appetite,³² and food consumption.^{18,19,23,27,29,32,33}

Concerning IR, studies suggest that antimicrobial treatment affects insulin sensitivity regardless of obesity (Tables 1 and 2). The intestinal microbiota has a modulatory potential on the immune system and incretins, while those play roles in insulin sensitivity. On this manner, studies that investigated the effect of antimicrobial treatment on IR have mainly evaluated whether the microbial modulation provided by this drug influences the activity of the immune system and the intestinal secretion of incretins.³⁴

The activation of the immune system by the intestinal microbiota can occur through the interaction of lipopolysaccharide (LPS), present in the cell wall of gram-negative bacteria, with the CD14/TLR-4 complex, located on the surface of the immune cells. This interaction can trigger a chronic low-grade inflammatory process, which can impair host metabolism, contributing to the development of IR. For the host to absorb LPS, it is necessary that its intestinal barrier be altered, a process which may occur depending on the composition of the intestinal microbiota.³⁵ Thus, to prevent the absorption of LPS, the antimicrobial can reduce the population of gram-negative bacteria in the intestinal microbiota or maintain/improve the intestinal barrier of its host (Figure 1).

In this way, it has been observed that the antimicrobial treatment can reduce the serum concentration of LPS,^{11,18,22,26,28,29} as well as pro-inflammatory cytokines.^{11,18,24,26-29} This result may be a consequence of the reduction in intestinal permeability caused by the treatment.^{22,28,31} Regarding the gram-negative bacteria, it is observed that when an antimicrobial with spectrum of action against these bacteria is used, its populations is reduced; however, when an antimicrobial with spectrum of action against gram-positive bacteria is used, the population of gram-negative increases, especially those belonging to the phylum Proteobacteria (Table 3). However, the treatment with an antimicrobial with spectrum of action against gram-positive

TABLE 1 Main results of the experimental studies that evaluated the effect of antimicrobial treatment on obesity and insulin resistance

Reference	Animal Model	Experimental Diet	Intervention (Antimicrobial, Dose, and Duration)	Main Results (Intervention vs Control Group)
Di Luccia et al ¹⁸	Male Sprague-Dawley rats with 14 wk old	Diet rich in fructose (20.4%)	Ampicillin (1 g/L) and neomycin (0.5 g/L) In the drinking water 8 wk	Did not alter body weight ↑ insulin sensitivity and glucose tolerance
Hwang et al ¹⁹	C57BL/6J male mice with 8 wk old	High-fat diet with 60% fat	Vancomycin (0.5 g/L) and bacitracin (1 g/L) In the drinking water 4 wk	Did not alter body weight and body fat mass ↓ insulinemia ↑ insulin sensitivity and glucose tolerance
Rajpal et al ²⁰	C57BL/6 male mice with 14 wk old	High-fat diet with 45% fat	Ceftazidime (50, 150, or 500 mg/kg) or vancomycin (50, 150, or 500 mg/kg) Mixed in the diet 2 wk	<i>Ceftazidime</i> : ↓ body weight and body fat mass (150 or 500 mg/kg); glycaemia and insulinemia (500 mg/kg) <i>Vancomycin</i> : ↓ body weight (150 mg/kg)
Rajpal et al ²⁰	Mice Zucker (ZDF- <i>Lepr^{fa}</i> /CrI) males with 7 wk old	Standard diet with 17% fat	Ceftazidime (500 mg/kg) Via gavage 2 wk	↓ HbA1c, fasting glycaemia, and insulinemia ↑ body weight
Del Fiol et al ²¹	Male Wistar rats	Standard diet	Amoxicillin (150 mg/kg) Via gavage 2 wk	Did not alter body weight and body composition
Ghosh et al ²²	Male LDLR ^{-/-} mice with 10 wk old	Diet with 21% fat and 0.15% of cholesterol	Neomycin (100 mg/d) polymyxin B (10 mg/d) In the drinking water 16 wk	Did not alter body weight and fasting glycaemia ↑ glucose tolerance
Jena et al ²³	Male Wistar rats with 8 to 10 wk old	Diet with 65% of fructose	Cefdinir Via gavage 4 wk	↓ body weight and fat mass, and glycaemia ↑ glucose tolerance
Rune et al ²⁴	Male C57BL/6NTac mice with 0 d old	High-fat diet with 60% fat	Ampicillin (1 g/L) In the drinking water 5 wk	Did not alter body weight and insulinemia ↓ HbA1c ↑ glucose tolerance
Bech-Nielsen et al ²⁵	C57BL/6 female mice with 3 wk old	Standard diet with 12.6% fat	Ampicillin (1 g/L) or erythromycin (1 g/L) In the drinking water 5 wk	Did not alter body weight ↓ fasting glycaemia ↑ glucose tolerance
Carvalho et al ²⁶	Male Swiss rats with 6 wk old	High-fat diet with 55% fat	Ampicillin (1 g/L), neomycin (1 g/L), and metronidazole (1 g/L) In the drinking water 8 wk	Did not alter the size of adipocytes ↓ body weight ↑ glucose tolerance and insulin sensitivity
Murphy et al ²⁷	C57BL/6J male mice with 7 wk of age	High-fat diet with 45% fat	Vancomycin (2 mg/d) Via gavage 8 wk	Did not alter insulinemia ↓ body weight
Cani et al ²⁸	Male C57BL/6J mice with 12 wk old	High-fat diet with 72% fat	Ampicillin (1 g/L) and neomycin (0.5 g/L) In the drinking water 4 wk	↓ body weight, adipocyte size, insulinemia, and fasting glycaemia ↑ glucose tolerance
Cani et al ²⁸	Male <i>ob/ob</i> mice with 6 wk old	Standard diet	Ampicillin (1 g/L) and neomycin (0.5 g/L) In the drinking water 4 wk	↓ body weight, adipocyte size, insulinemia, and fasting glycaemia
Chou et al ²⁹	Male <i>ob/ob</i> mice	Standard diet	Norfloxacin (1 g/L) and ampicillin (1 g/L) In the drinking water 2 wk	Did not alter body weight ↓ fasting glycaemia and insulinemia ↑ glucose tolerance and insulin sensitivity
Chou et al ²⁹	Male C57BL/6J mice	Standard diet	Polymyxin B (0.5 g/L) and neomycin (1 g/L) In the drinking water 2 wk	Did not alter body weight and fasting glycaemia
Membrez et al ¹¹	Male <i>ob/ob</i> mice with 8 to 10 wk old	Standard diet	Norfloxacin (1 g/L) and ampicillin (1 g/L) In the drinking water 17 d	Did not alter body weight ↓ fasting glycaemia and insulinemia ↑ glucose tolerance
Membrez et al ¹¹	Male C57BL/6J mice 6 to 7 wk old	High-fat diet with 60% fat	Norfloxacin (1 g/L) and ampicillin (1 g/L) In the drinking water 17 d	Did not alter body weight ↓ fasting glycaemia and glucose tolerance

Abbreviations: HbA1c, glycated haemoglobin; ↑, increased; ↓, decreased.

TABLE 2 Main results of the clinical trials that evaluated the effect of antimicrobial treatment on obesity and insulin resistance

Reference	Study Participants	Study Design	Intervention (Antimicrobial, Dose, and Duration)	Main Results (Intervention vs Placebo Group)
Mathur et al ³⁰	11 adult subjects, obese, pre-diabetic, and with methane-positive breath	Transversal	Rifaximin (1650 mg/d) and neomycin (1000 mg/d) 10 d	Did not alter body weight ↓ fasting glucose and insulinemia
Reijnders et al ³¹	57 adult Caucasian men, overweight or obese, glucose intolerant and insulin resistant	Randomized, double-blind, placebo controlled	Amoxicillin or vancomycin 1500 mg/d 7 d	Did not alter body weight, size and number of adipocytes, fasting glycaemia, insulinemia, HOMA index, and the sensitivity of adipose tissue and liver to insulin.
Mikkelsen et al ³²	12 adult male, Caucasian, healthy and eutrophic	Prospective with reassessment 180 d after the intervention	Vancomycin (500 mg/d), gentamicin (40 mg/d) and meropenem (500 mg/d) 4 d	Did not alter body weight, fasting glycaemia, insulinemia, HOMA index, and serum concentrations of C peptide and HbA1c.
Vrieze et al ³³	20 Caucasian men with metabolic syndrome	Randomized, single blind, placebo controlled	Amoxicillin or vancomycin 1500 mg/d 7 d	Did not alter body weight, insulinemia and fasting glucose.

Abbreviations: HbA1c, glycated haemoglobin; HOMA, homeostatic model assessment; ↓, decreased.

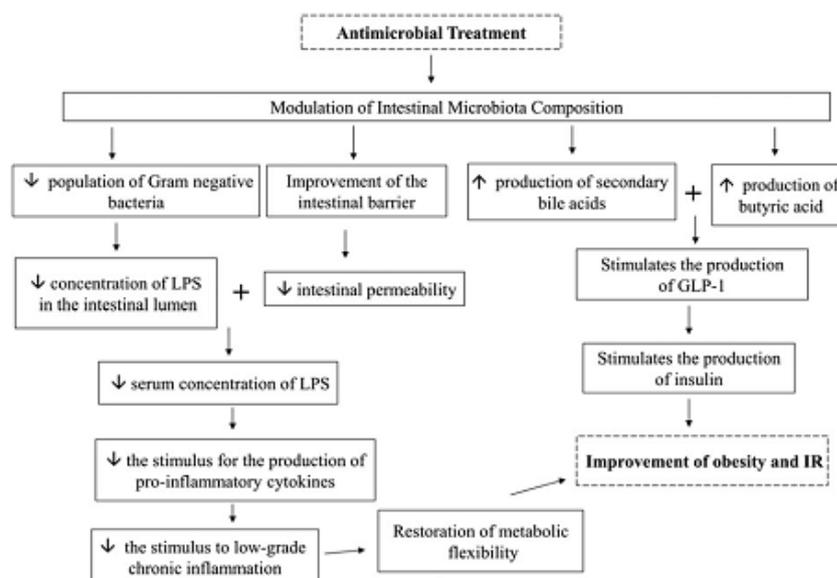


FIGURE 1 The potential mechanisms used by antimicrobials to improve obesity and insulin resistance (IR). The effects produced by antimicrobial treatment would be a consequence of the modulation of the composition of the intestinal microbiota. This modulation may lead to a reduction in the population of gram-negative bacteria, which contain lipopolysaccharide (LPS) in their cell walls. Additionally, such modulation would improve the intestinal barrier and consequently reduce intestinal permeability. All of these would culminate in reducing the stimulation of the immune system by LPS, decreasing the stimulus for low-grade chronic inflammation, that characterizes these diseases and helping restore metabolic flexibility. Another mechanism is related to the increase in glucagon-like peptide-1 (GLP-1) production, which would be a consequence of the activity of the metabolites produced by the microbiota, such as secondary bile acids and short-chain fatty acids. The increase in the serum concentration of GLP-1 stimulates the pancreatic production of insulin

bacteria is also capable of improving the intestinal permeability of its consumers.¹⁹ Thus, these antimicrobials can be used in the adjuvant treatment of IR as long as they do not increase intestinal permeability.

The incretin, glucagon-like peptide-1 (GLP-1), can regulate carbohydrate metabolism through the stimulation of insulin production by the pancreas in the postprandial state. Glucagon-like peptide-1 is produced by the enteroendocrine L cells, mainly located in the ileum and colon.³⁶ It has been suggested that the intestinal microbiota is capable of regulating the production of this incretin, through the activity of

some metabolites it produces,³² such as the secondary bile salts and short-chain fatty acids (SCFA) (Figure 1). In this way, it is possible that changes in the composition of the microbiota caused by antimicrobial treatment could interfere in the production of GLP-1 and consequently IR.

Secondary bile salts are produced by some specific microorganisms found in the intestinal microbiota through the deconjugation, oxidation, and dehydroxylation of primary bile salts. These secondary bile salts could bind to G-protein receptors, specifically TGR5, present in

TABLE 3 Effect of the antimicrobial treatment on intestinal microbiota composition

Reference	Sample	Method	Antimicrobial	Main Results (Antimicrobial vs Placebo)
Mathur et al ³⁰	Faeces	q-PCR	Rifaximin and neomycin	... ↓ <i>Methanobrevibacter smithii</i> species
Reijnders et al ³¹	Faeces	Microarray (human intestinal tract chip analysis)	Vancomycin	↑ Phylum Proteobacteria, members of the cluster of <i>Clostridium</i> IX, genus <i>Enterococcus</i> and species <i>Lactobacillus plantarum</i> ↓ Phylum Firmicutes, members of the cluster of <i>Clostridium</i> IV and XIV as the species <i>Coprococcus eutactus</i> , <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , <i>Anaerostipes caccae</i> and <i>Clostridium leptum</i>
Di Luccia et al ¹⁸	Cecal content	Pyrosequencing	Ampicillin and neomycin	↑ Phyla Proteobacteria and Bacteroidetes, and the class Bacteroidia ↓ Class Bacilli, and genera <i>Coprococcus</i> and <i>Ruminococcus</i> .
Hwang et al ¹⁹	Cecal content	Pyrosequencing	Vancomycin and bacitracin	↑ Phylum Proteobacteria and the specie <i>Escherichia coli</i> ↓ Phylum Firmicutes, mainly the family Lachnospiraceae; and the phylum Bacteroidetes, mainly the family Porphyromonadaceae
Mikkelsen et al ³²	Faeces	Plating in specific media	Vancomycin, gentamicin and meropenem	... ↓ Total anaerobes, coliforms, and the genera <i>Enterococci</i> and <i>Bifidobacterium</i>
Rajpal et al ²⁰	Faeces	Sequencing of metagenomic DNA	Vancomycin	↑ Phylum Proteobacteria ...
Rajpal et al ²⁰	Faeces	Sequencing of metagenomic DNA	Ceftazidime	↑ Phylum Firmicutes, mainly the genus <i>Lactobacillus</i> ↓ Phylum Bacteroidetes and the class clostridia
Vrieze et al ³³	Faeces	Microarray (Human Intestinal Tract Chip phylogenetic).	Vancomycin	↑ Phylum Proteobacteria, mainly the genera <i>Haemophilus</i> and <i>Serratia</i> , and the species <i>E. coli</i> and <i>L. plantarum</i> ↓ Phylum Firmicutes, mainly the clusters of <i>Clostridium</i> IV and XIVa, and the species <i>F. prausnitzii</i> and <i>Eubacterium hallii</i>
Jena et al ²³	Cecal content	Plating in specific media	Cefdinir	... ↓ Family Enterobacteriaceae
Carvalho et al ²⁶	Faeces	Metagenomic analyses (BLASTX)	Ampicillin, neomycin and metronidazole	↑ Phylum Proteobacteria ↓ Phyla Bacteroidetes, Verrucomicrobia and Firmicutes
Murphy et al ²⁷	Feses	Pyrosequencing	Vancomycin	↑ Phylum Proteobacteria; families Enterobacteriaceae, Streptococcaceae, Desulfovibrionaceae, and Alcaligenaceae; genera <i>Lactococcus</i> , <i>Sutterella</i> , and <i>Desulfovibrio</i> ↓ Phylum Firmicutes and Bacteroidetes; families Clostridiaceae, Bacteroidaceae, Porphyromonadaceae and Deferribacteres; and the genera <i>Bacteroides</i> , <i>Clostridium</i> , and <i>Odoribacter</i>
Cani et al ²⁸	Cecal content of the ob/ob mice	DGGE	Ampicillin and neomycin	... ↓ Genera <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Bacteroides</i> , and <i>Prevotella</i>
Cani et al ²⁸	Cecal content of the mice feed with the high-fat diet	DGGE	Ampicillin and neomycin	↑ Genera <i>Lactobacillus</i> , <i>Bacteroides</i> , and <i>Prevotella</i> ↓ Genera <i>Bifidobacterium</i>
Chou et al ²⁹	Faeces	Plating in specific media	Norfloxacin	... ↓ Family Enterobacteriaceae
Chou et al ²⁹	Faeces	Plating in specific media	Ampicillin	... ↓ Genus <i>Bacteroides</i>
Membrez et al ¹¹	Cecal content	Plating in specific media	Norfloxacin	... ↓ Family Enterobacteriaceae
Membrez et al ¹¹	Cecal content	Plating in specific media	Ampicillin	... ↓ Genus <i>Bacteroides</i>

Abbreviations: DGGE, gel electrophoresis with denaturing gradient; q-PCR, quantitative polymerase chain reaction; ↑, increased; ↓, decreased.

the L cell membrane, stimulating the production of GLP-1.^{37,38} In this regard, Reijnders et al³¹ and Vrieze et al³³ observed that the treatment with vancomycin (1500 mg/d for 7 d) reduced faecal excretion of secondary bile salts and increased primary bile salts, while amoxicillin

(1500 mg/d for 7 d) did not alter bile salt homeostasis in comparison with placebo. As a consequence of these effects, no differences were observed in fasting and postprandial serum GLP-1 concentrations, as well as IR-related parameters.

Considering that vancomycin acts mainly against gram-positive bacteria, which are the primarily responsible for initiating the production of secondary bile salts,³⁹ it is then probable that the changes in the intestinal microbiota composition associated with vancomycin treatment would have compromised the production of secondary bile salts (Table 3). Corroborating with this hypothesis, treatment with amoxicillin was unable to influence bile salt homeostasis, since the composition of the intestinal microbiota of the treated individuals remained similar to the placebo group (Table 3).

The modulation of the intestinal microbiota with the aim to increase the production of secondary bile acids should be carried with caution, since high concentrations of these bile acids may increase the risk of developing colorectal cancer because they increase local production of free radicals, stimulate the synthesis of prostaglandin E₂, activate the β -catenin/Wnt signalling pathway and alter the intestinal barrier. Furthermore, secondary bile acids can prevent the repair of damaged DNA and favours the resistance of cancer cells to apoptosis.^{40,41}

Another metabolite capable of influencing the production of GLP-1 is butyric acid. This SCFA could interact with the G-protein receptors, stimulating the expression of the transcription factor cdx-2, which would act on the proglucagon gene promoter region increasing the expression of GLP-1.⁴² The primary bacteria that produce butyric acid belong to the Firmicutes phylum, mainly the Clostridia IV and XIVa groups, being the main producing species *Faecalibacterium prausnitzii*, *Coprococcus eutactus*, and *Eubacterium rectale*.⁴³

Regarding the effect of antimicrobial treatment on the production of butyric acid, Reijnders et al³¹ observed that treatment with vancomycin (1500 mg/d for 7 d) reduced the faecal concentration of total SCFA and butyric acid. This result could be a consequence of the decrease in the bacteria population that produces butyric acid in the intestinal microbiota as a consequence of the vancomycin treatment (Table 3). Further, the authors observed that treatment with amoxicillin (1500 mg/d, for 7 d) did not alter the faecal concentration of this SCFA as well as the composition of the intestinal microbiota of the treated individuals compared with placebo.

The production of SCFA depends on the composition of the microbiota and the availability of substrate, mainly indigestible carbohydrates.⁴³ Obese and/or IR individuals tend to consume low amounts of fibre; thus, even if there is an increase in the population of SCFA-producing bacteria as a consequence of the antimicrobial treatment, it does not necessarily guarantee an increase in the production of SCFA.

To date, it has not been possible to determine a specific antimicrobial for the adjuvant treatment of obesity and/or IR that would provide positive results. It is likely that the findings so far were influenced by the different experimental designs (type, dose, and duration of treatments), the population investigated, and the animal models used. Furthermore, the pharmacokinetics, pharmacodynamics, path of administration, and spectrum of action may influence the modulatory effect of an antimicrobial. Moreover, inherent consumer characteristics such as age, composition of the initial intestinal microbiota and lifestyle would also influence the modulatory effect of antimicrobials.¹³

Obesity is a complex disease, which requires a multiprofessional intervention for its treatment. Since antimicrobial treatment only acts on one casual factor, an investigation into the outcome of the treatment when associated with dietary re-education and the practice of regular physical activity is of great interest. In some cases, the antimicrobial treatment was capable of restoring the metabolic flexibility of the liver, muscle, and adipose tissue,^{11,20,23,26,29} which could contribute to weight loss if the treatment period is extended; however, prolonged antimicrobial treatment is not recommended.

In general, studies suggest that, partially, the effect of antimicrobial treatment on IR could be attributed to reduced interaction of LPS with the immune system. Regarding the production of GLP-1, the influence of antimicrobials appears to be limited. However, it is worth mentioning that the increase in GLP-1 production does not necessarily imply an improvement in IR, since some alterations in the insulin receptor could compromise the adequate binding of the insulin produced as a consequence of GLP-1 stimulation.

Thus, more studies are necessary for the mechanisms used by the antimicrobials that would lead to this improvement in obesity, and IR can be better understood and afterwards amplified so that better results can be obtained.

3 | MAIN LIMITATIONS OF THE STUDIES

Most of the experimental studies included in this review administered the antimicrobial by diluting a given amount of the drug in the drinking water of the animal model (Table 1). Although 3 of these studies^{11,18,19} quantified the amount of water consumed by the animals, it is difficult to define the actual amount of antimicrobial consumed. Such information is essential for conducting further studies as well as justifying results. Thus, an alternative solution to this limitation would be the administration of the antimicrobial via gavage, ensuring that the pre-established dose is consumed.

The clinical trials, included in this review, did not evaluate the composition of the diets consumed by the participants. Diet exerts a great modulatory effect on the composition of the intestinal microbiota³ and influences the modulatory potential of antimicrobials,²⁸ being therefore essential to verify if there were changes in diet during the treatment period, mainly in the consumption of macronutrients and fibres.

Another limitation concerns the use of absorbable antimicrobials such as norfloxacin, amoxicillin, and ampicillin, which have limited effect on TGI levels but could interfere with insulin sensitivity through its systemic activity.¹¹ Thus, it is suggested that studies aiming to investigate the effect of antimicrobials on obesity and IR through the modulation of the intestinal microbiota should use only antimicrobials that act locally on TGI (non-absorbable).

4 | FUTURE PERSPECTIVES

The indiscriminate use of antimicrobials can lead to the development of antimicrobial-resistant microorganisms, which is a cause of great concern because of the risk of spreading infectious diseases.⁴⁴ Therefore, the choice of the type of antimicrobial as well as dose and

duration of treatment should take into account the possibility of antimicrobial resistance, especially in clinical trials. Moreover, it should be investigated whether antimicrobial treatment provides better results than the regular consumption of probiotic, prebiotic, or symbiotic foods. Since these foods can modulate the composition of the intestinal microbiota without contributing to the development of antimicrobial-resistant microorganisms.⁴⁵

The modulatory effect of antimicrobials on the composition of the intestinal microbiota should be investigated in the long term, since their regular use may increase the proliferation of microorganisms that contribute to the development of other diseases.¹³ Some studies observed that treatment with antimicrobials resulted in the increase of the Enterobacteriaceae family (Table 3), which comprises some species related to the increased risk of developing colorectal cancer.^{46,47}

As discussed earlier, the metabolites produced by the microbiota exert considerable influence on host metabolism.³⁴ In this sense, future studies on microbial treatment should make an effort not to only identify changes in the composition of microorganisms but also the metabolites produced by them.

In the future, it is necessary to investigate the minimum age at which antimicrobial treatment of chronic non-infectious diseases can be realized, since it has been suggested that the intake of antimicrobials during infancy may contribute to the development of obesity.⁴⁸ Another aspect to be investigated is the duration of the effectiveness of antimicrobial treatment after its discontinuation. It is possible that if there are no lifestyle changes, the composition of the intestinal microbiota could return to its initial state, accompanied with metabolic changes that lead to the development of obesity and IR.³²

5 | CONCLUSIONS

Regarding obesity, the effects of antimicrobial treatment appear to be limited. For IR, so far, positive results have been reported only in experimental studies, whereas in clinical trials, no changes were observed. Regarding the mechanisms used, it was proposed that antimicrobial treatment would interfere in the activation of the immune system by LPS and modulate the production of incretins; however, the results are still inconclusive.

In this light, further studies are needed in order to better understand the effect of antimicrobial on obesity and IR. In addition, the risks associated with the regular use of this drug should be investigated, as well as comparing its effect with other potential modulators of the composition of the intestinal microbiota.

ACKNOWLEDGEMENTS

Our work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). All authors contributed significantly to the manuscript and declared that they have no conflict of interest.

ORCID

Sandra Aparecida dos Reis  <http://orcid.org/0000-0002-3565-1589>

REFERENCES

- Sirisinha S. The potential impact of gut microbiota on your health: current status and future challenges. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2016;34(4):249-264.
- Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nat Rev*. 2013;11:227-238.
- Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 2006;124(4):837-848.
- Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *PNAS* 2004;101(44):15718-15723.
- Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am J Clin Nutr*. 2011;94(1):58-65.
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022-1023.
- Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(31):11070-11075.
- Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature Lettres*. 2009;457(7228):480-485.
- Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 2008;3(4):213-223.
- World Health Organization (2017) Obesity and overweight - Factor sheet 311. Geneva, Switzerland: WHO. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> (accessed May, 2017).
- Membrez M, Blancher F, Jaquet M, et al. Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *FASEB J*. 2008;22(7):2416-2426.
- Pidot SJ, Coyne S, Kloss F, Hertweck C. Antibiotics from neglected bacterial sources. *Int J Med Microbiol*. 2014;304(1):14-22.
- Ianiro G, Tilg H, Gasbarrini A. Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: between good and evil. *Gut*. 2016;65(11):1906-1915.
- Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK, Dumas M-E. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Med*. 2016;8(42):1-12.
- Schwartz A, Taras D, Schafer K, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity*. 2010;18(1):190-195.
- Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(4):894-899.
- Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(7):2365-2370.
- Di Luccia B, Crescenzo R, Mazzoli A, et al. Rescue of fructose-induced metabolic syndrome by antibiotics or faecal transplantation in a rat model of obesity. *PLoS ONE*. 2015;10(8):1-19.
- Hwang I, Park YJ, Kim Y-R, et al. Alteration of gut microbiota by vancomycin and bacitracin improves insulin resistance via glucagon-like peptide 1 in diet-induced obesity. *FASEB J*. 2015;29:1-15.
- Rajpal DK, Klein J-L, Mayhew D, et al. Selective spectrum antibiotic modulation of the gut microbiome in obesity and diabetes rodent models. *PLoS One*. 2015;10(12):1-19.
- Del Fiol FDS, Ferreira ACMT, Marciano JJ, Marques MC, Sant'Ana LL. Obesity and the use of antibiotics and probiotics in rats. *Chemotherapy*. 2014;60:162-167.
- Ghosh SS, Bie J, Wang J, Ghosh S. Oral supplementation with non-absorbable antibiotics or curcumin attenuates western diet-induced atherosclerosis and glucose intolerance in LDLR^{-/-} mice: role of intestinal permeability and macrophage activation. *PLoS ONE*. 2014;9(9):1-9.

6 ARTIGO II – ORIGINAL

Título: Uso do Antimicrobiano Ceftriaxona Não é Recomendado no Tratamento Adjuvante do Excesso de Peso.

Resumo

Considerando o potencial efeito dos moduladores da composição da microbiota intestinal sobre o excesso de peso. O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito do tratamento contínuo com um antimicrobiano e/ou um probiótico sobre o excesso de peso e alterações metabólicas secundárias em modelo animal. Inicialmente camundongos C57BL/6J machos foram submetidos a um protocolo de indução de excesso de peso que teve duração de 12 semanas, no qual os animais foram alimentados com dieta *high-fat* com 60% das calorias provenientes de lipídios e uma solução de frutose a 10% no lugar da água de beber. Após esse período, teve início a fase de tratamento, com duração de 4 semanas, no qual os camundongos foram divididos aleatoriamente nos grupos: controle (n = 7), tratado com água destilada; probiótico (n = 7), tratado com 10⁹ UFC de *Lactobacillus gasseri*; antimicrobiano (n = 7), tratado com 500 mg/kg de ceftriaxona; e antimicrobiano mais probiótico (n = 7) que recebeu nas primeiras 2 semanas 500 mg/kg de ceftriaxona e nas 2 semanas subsequentes 10⁹ UFC de *L. gasseri*. Constatou-se que o tratamento com o probiótico levou ao ganho de gordura corporal, a qual teria influenciado negativamente o metabolismo da glicose e contribuído para uma maior deposição de gordura no tecido hepático. Contudo, como não existem relatos negativos associados ao uso contínuo desse microrganismo e portanto, seu uso não deve ser desconsiderado. Em contrapartida, o tratamento com o antimicrobiano de forma isolada ou conjugada, proporcionou uma redução da gordura corporal, no entanto, esse efeito seria consequência da ação negativa da ceftriaxona sobre a estrutura das vilosidades intestinais, o que levou a uma redução da superfície absorptiva. Assim, com base nos resultados obtidos, não recomenda-se que o antimicrobiano ceftriaxona seja utilizado no tratamento adjuvante do excesso de peso em função do potencial risco de desenvolvimento de doença inflamatória intestinal.

Palavras-chave: microbiota intestinal, modulação intestinal, ceftriaxona.

Title: The Use of Ceftriaxone is Not Recommended for the Adjuvant Therapy of Overweight.

Abstract

Considering the potential effect of gut microbiota composition modulators on overweight. This study aimed to investigate the effect of continuous treatment with an antimicrobial and/or probiotic on overweight and secondary metabolic changes in an animal model. Initially male C57BL/6J mice underwent a 12-week overweight induction protocol in which the animals were fed a high-fat diet with 60% of the calories from lipids and a 10% fructose solution. After this period, the 4-week treatment phase began, in which the mice were randomly divided into the following groups: control (n = 7), treated with distilled water; probiotic (n = 7) treated with 10^9 CFU of *Lactobacillus gasseri*; antimicrobial (n = 7) treated with ceftriaxone 500 mg/kg; and antimicrobial plus probiotic (n = 7) which received in the first 2 weeks 500 mg/kg ceftriaxone and in the subsequent 2 weeks 10^9 CFU of *L. gasseri*. Probiotic treatment led to body fat gain, which would have negatively influenced glucose metabolism and contributed to increased fat deposition in liver tissue. However, as there are no negative reports associated with the continuous use of this microorganism, its use should not be disregarded. In contrast, treatment with the antimicrobial alone or in combination provided a reduction in body fat; however, this would be a consequence of the negative action of ceftriaxone on the structure of intestinal villi, which led to a reduction in the absorbed surface. Thus, based on the results obtained, it is not recommended that ceftriaxone be used in the adjuvant treatment of overweight due to the potential risk of developing inflammatory bowel disease.

Keywords: intestinal microbiota, intestinal modulation, ceftriaxone.

6.1 Introdução

Nas últimas duas décadas a microbiota intestinal tem sido apontada como um dos principais fatores que determinam o estado de saúde e de doença de um indivíduo (BECATTINI, TAUR e PAMER, 2016). Evidências sugerem que a disbiose intestinal é fator de risco ambiental para o desenvolvimento do excesso de peso corporal (COX, WEST e CRIPPS, 2015).

A disbiose intestinal pode ser caracterizada pela ocorrência de forma isolada ou conjunta do aumento da população de microrganismos patogênicos, da redução da população de microrganismos comensais e da redução da diversidade da microbiota (LEVY et al., 2017).

Na presença da disbiose, a microbiota intestinal seria capaz de aumentar a extração de energia da dieta (BACKHED et al., 2004; JUMPERTZ et al., 2011), bem como a absorção intestinal de macronutrientes (HOOPER et al., 2001; STAPPENBECK, HOOPER e GORD, 2002); modular a expressão e o funcionamento de proteínas relacionadas com os processos de armazenamento e metabolismo energético (BACKHED et al., 2004; BACKHED et al., 2007); e induzir um estado inflamatório crônico de baixo grau (CANI et al., 2007). Por meio desses mecanismos a microbiota seria capaz de estimular o ganho de gordura corporal (BÄCKHED, 2011).

O aumento global da incidência do excesso de peso (WHO, 2016) e as consequências negativas para a saúde que esse quadro pode desencadear (ABESO, 2016) tem impulsionado a investigação do efeito do tratamento adjuvante com moduladores da composição da microbiota intestinal sobre o excesso de peso (BORODY e KHORUTS, 2012; BRUSAFERRO et al., 2018; DORÉ e BLOTTIÈRE, 2015; REIS, PELUZIO e BRESSAN, 2018).

Tem-se observado que o uso contínuo dos antimicrobianos pode provocar perda de gordura corporal (CARVALHO et al., 2012; JENA et al., 2013; RAJPAL et al., 2015) no entanto, o uso contínuo desse medicamento não é aconselhável, tendo em vista o risco de desenvolvimento de microrganismos resistentes (BECATTINI et al., 2016; WILLYARD, 2017).

O uso contínuo dos probióticos também pode provocar reduções na massa de gordura corporal (KANG et al., 2013; KAWANO et al., 2016; MIYOSHI et al., 2014), a depender da estirpe utilizada (CROVESY et al., 2017; DRISSI, RAOULT e MERHEJ, 2017). Adicionalmente, o uso contínuo desses

microrganismos não acarreta danos à saúde de seu consumidor (HILL et al., 2014).

Considerando que são escassos os estudos que compararam o efeito do tratamento contínuo com um antimicrobiano e um probiótico, de forma isolada ou conjugada, sobre o excesso de peso, esse estudo teve como objetivo investigar o efeito do tratamento contínuo com antimicrobiano e/ou probiótico sobre o excesso de peso e alterações metabólicas secundárias em modelo animal.

6.2 Materiais e Métodos

6.2.1 Animais

Vinte e oito camundongos C57BL/6J machos provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV foram utilizados no experimento. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com ciclo claro/escuro de 12h e temperatura média de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Durante todo o período experimental, os animais tiveram livre acesso a solução de frutose e a dieta, os quais foram administrados seguindo o esquema de *pair-feeding*.

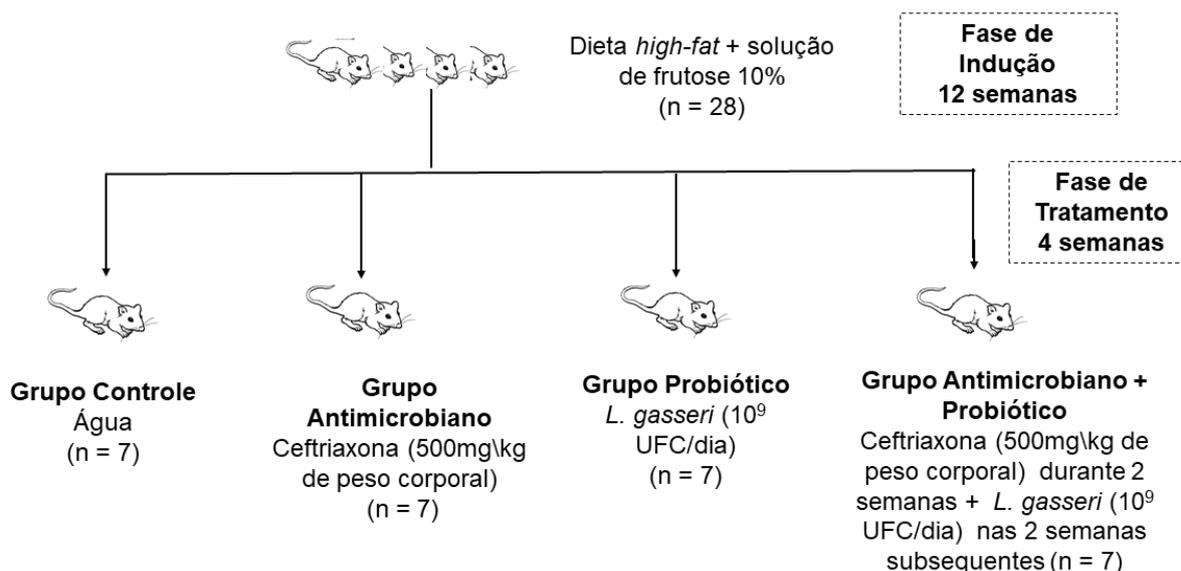
O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFV, número 09/2017 (Anexo A).

6.2.2 Desenho Experimental

Inicialmente os camundongos foram submetidos a um protocolo de indução do excesso de peso que teve duração de 12 semanas (fase de indução). Durante esse período, os animais foram alimentados com dieta *high-fat* com 60% das calorias provenientes de lipídios (MEMBREZ et al., 2008) e uma solução de frutose (Synth[®], Diadema, Brasil) a 10% no lugar da água de beber (VEDOVA et al., 2016).

Após esse período, teve início a fase de tratamento onde os camundongos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, sendo: controle (n = 7), probiótico (n = 7), antimicrobiano (n = 7) e antimicrobiano mais probiótico (antimicrobiano+probiótico) (n = 7) (Figura 6). Essa fase teve duração de quatro semanas e os animais continuaram a receber as mesmas dietas e a solução de frutose que lhes foram administradas na fase de indução. Todos os tratamentos foram administrados diariamente via gavagem.

Figura 6 - Desenho experimental.



Fonte: elaborada pelo autor. Camundongos C57BL/6J machos (n = 28) receberam dieta *high-fat* 60% e solução de frutose a 10% em substituição à água de beber durante 12 semanas, na denominada fase de indução. Posteriormente, teve início a fase de tratamento com duração total de 4 semanas. Para tanto, os camundongos foram subdivididos em 4 grupos experimentais, sendo controle tratado com água; antimicrobiano tratado com ceftriaxona (500 mg/kg); probiótico tratado com *L. gasseri* (10⁹ UFC/dia); e antimicrobiano mais probiótico, que nas duas semanas iniciais foi tratado com ceftriaxona (500 mg/kg) e nas duas semanas subsequentes recebeu *L. gasseri* (10⁹ UFC/dia).

Os animais do grupo controle positivo foram tratados com água destilada. O grupo antimicrobiano foi tratado com 500 mg/kg (RAJPAL et al., 2015) de ceftriaxona (Triaxton®, Blau Farmacêutica S/A) diluídos em PBS. Esse antimicrobiano foi selecionado, pois atua, principalmente, contra as bactérias do tipo gram-negativas, as quais em função do LPS, têm sido relacionadas com o aumento do risco para o desenvolvimento do excesso de peso. Além disso a ceftriaxona não é absorvido pelo organismo, agindo localmente no intestino delgado e no cólon (AUDA et al., 2009; MRESTANI et al., 2004). A dose escolhida foi baseada no estudo de Rajpal et al. (2015) o qual obteve melhores resultados com relação ao excesso de peso ao tratar um modelo animal semelhante ao do presente estudo com 500 mg de ceftazidima (cefalosporina de terceira geração)/kg de massa corporal.

Já o grupo probiótico, recebeu 10⁹ UFC de *Lactobacillus gasseri* (Lemma Supply Solutions®, Brooklin Paulista, Brasil) diluídos em PBS. Sendo, esse probiótico selecionado em função de seus efeitos positivos descritos na literatura

científica sobre o excesso de peso e adiposidade corporal (KANG et al., 2013; KAWANO et al., 2016; MIYOSHI et al., 2014; SHI et al., 2013).

O grupo antimicrobiano+probiótico recebeu nas primeiras duas semanas da fase de tratamento 500 mg/kg (RAJPAL et al., 2015) de ceftriaxona (Triaxton[®], Blau Farmacêutica S/A) e nas duas semanas subsequentes 10⁹ UFC de *L. gasseri* (Lemma Supply Solutions[®], Brooklin Paulista, Brasil). Com esse esquema de tratamento espera-se que o antimicrobiano elimine as bactérias relacionadas com o aumento do risco para o desenvolvimento do excesso de peso e o probiótico recolonize mais rapidamente esse ambiente, levando a uma redução no ganho de massa corporal (DEL FIOLE et al., 2014).

Ao término da fase de tratamento os animais foram submetidos a eutanásia, sendo inicialmente anestesiados com isoflurano à 3% (Cristália[®], Belo Horizonte, Brasil) e posteriormente submetidos à exsanguinação total (BRASIL, 2008). Amostras de sangue e dos tecidos foram coletadas e armazenadas para as análises posteriores.

6.2.3 Massa e Medidas Corporais

A massa corporal dos animais foi verificada semanalmente por meio de pesagem em balança. Com relação às medidas corporais (perímetros abdominal e torácico, e comprimento focinho ânus), essas foram aferidas ao final da fase de tratamento, sendo calculado o índice de Lee (DEL FIOLE et al., 2014).

6.2.4 Consumo Alimentar, Hídrico e Calórico

O consumo alimentar foi avaliado a partir da diferença de peso entre a quantidade de dieta ofertada e a quantidade restante não consumida. A solução de frutose ofertada e consumida durante todo o experimento também foi quantificada. O consumo calórico dos animais foi estimado com base na quantidade de dieta *high-fat* 60% (5,177 kcal/g de dieta) e solução de frutose (4 kcal/g de frutose) consumidas.

6.2.5 Teste de Tolerância Oral à Glicose

O TTOG foi realizado no final da fase de tratamento. Para tanto, os camundongos permaneceram 12h em jejum e a solução de frutose a 10% foi substituída por água destilada.

As coletas foram realizadas a partir de um pequeno corte na extremidade da cauda do animal e a leitura foi realizada com o auxílio de tiras reagentes (Accu-Check® Active, Risch-Rotkreuz, Suíça). Após a primeira leitura (tempo 0), foi administrada aos animais via gavagem uma solução de glicose à 25% (2 g/kg de massa corporal) e amostras de sangue foram coletadas após 15, 30, 60 e 90 min. Com isso, foi possível calcular a AUC de glicose para cada animal (HWANG et al., 2015).

6.2.6 Análises Bioquímicas

Colesterol total, HDL-colesterol, triglicerídeos, ALT e AST foram determinados nas amostras de soro, por meio de *kits* comerciais (Bioclin®/Quibasa, Belo Horizonte, Brasil). As concentrações da LDL-colesterol foram calculadas de acordo com Friedwald et al. (1972).

6.2.7 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

A expressão gênica das enzimas hepáticas SREBP-1, acetilCoA carboxilase-1 e ácido graxo sintase; bem como a expressão intestinal do SGLT-1, do TLR4 e do MyD88 foi avaliada por meio da técnica de RT-PCR.

O RNAm foi extraído com Trizol (Invitrogen®, EUA), segundo as recomendações do fabricante. Para a confecção do cDNA utilizou-se o *kit GoScript™ Reverse Transcription System* (A5000, Promega®, Brasil). As sequências de *primers* utilizadas (Apêndice B) foram comparadas com o BLAST quanto a especificidade para o modelo animal.

As análises foram realizadas em termociclador (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) e as quantidades relativas de RNAm foram avaliadas de acordo com o método $\Delta\Delta Ct$. Os resultados foram expressos em relação ao gene endógeno RPL.

6.2.8 Permeabilidade Intestinal

O teste de permeabilidade intestinal foi realizado ao final da fase de tratamento. Os animais receberam via gavagem 200 μ L de uma solução contendo lactulose (Daiichi Sankyo, Barueri, Brasil) e manitol (Synth®, Diadema, Brasil), e toda a urina excretada nas 24h subseqüentes foi coletada (JIN et al., 2008).

A quantificação dos açúcares foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu®, detector modelo: RID 10A, Japão) utilizando comprimento de onda de 210 nm. Para a separação cromatográfica, 20 µL de amostra foram injetadas em uma coluna móvel (Aminex®, modelo HPX-87H, EUA) com 300 mm x 7,8 mm de diâmetro com fluxo de 1 mL/min e pressão de 54 kgf utilizando como fase móvel água.

6.2.9 Análises Histológicas

Após fixação, amostras de tecido adiposo abdominal, fígado e intestino delgado foram desidratadas em gradiente crescente de etanol e incluídas em parafina (tecido adiposo e fígado) e resina (intestino). Posteriormente, fragmentos histológicos com 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo e corados com hematoxilina e eosina.

Para as análises histológicas, fotomicrografias foram obtidas diretamente do microscópio de luz (Zeiss 2012, Primo Star) e analisadas com o auxílio do software Image Pro-Plus® versão 4.5 (Media Cybernetics, EUA).

Tecido Adiposo

Para a contagem e aferição da área dos adipócitos, 10 campos/animal foram capturados com a objetiva de 10X. A partir das fotomicrografias foram contabilizadas todas as células que apresentaram contornos bem definidos e que estavam completas no campo da foto, e aferido o diâmetro de 20 células/campo, sendo o diâmetro de uma mesma célula aferido duas vezes em diferentes posições.

Tecido Hepático

As fotomicrografias foram obtidas a partir da varredura de todo o tecido sendo as imagens capturadas com a objetiva de 20X. Para a contagem das gotículas de gordura e núcleo picnótico sobrepôs-se uma grade padrão (75 linhas x 75 colunas) nos campos fotografados, sendo contabilizadas apenas as gotículas e núcleos coincidentes com as interseções da grade. Já o infiltrado inflamatório foi contabilizado sempre que presente na imagem.

Intestino Delgado

Para as análises morfométricas (altura e largura das vilosidades, e profundidade das criptas) foram capturados 10 campos aleatórios/animal, sendo as fotomicrografias obtidas com a objetiva de 10X.

A altura das vilosidades foi aferida apenas nas vilosidades com epitélio bem definido e tecido conjuntivo visível. A largura das vilosidades foi aferida em 3 (apical, medial e basal) pontos diferentes em uma mesma vilosidade, considerando-se o valor médio como resultado. A profundidade das criptas foi aferida nas imagens onde era possível ver a base e o ápice (abertura) da cripta (ROSA et al., 2010).

6.2.10 Análise Estatística

A normalidade das variáveis foi determinada de acordo com o teste de Kolmogorov-Smirnov.

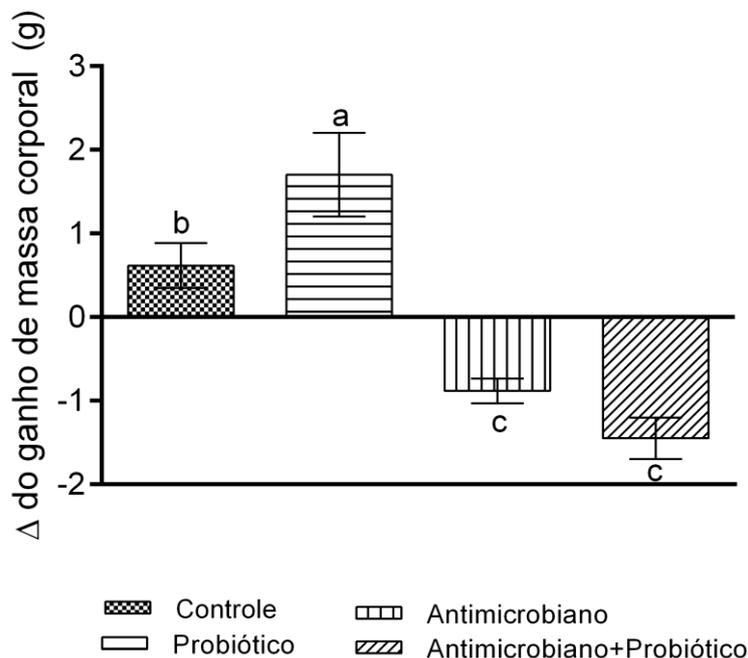
As comparações entre os grupos experimentais foram realizadas segundo análise de variância (ANOVA) seguida do teste *post hoc* de Tukey para dados paramétricos. Para os dados não paramétricos, foi aplicado o teste de Kruskal Wallis complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn's.

Foi considerado um $\alpha < 0,05$ como significativo e os resultados foram expressos como média \pm erro padrão ou mediana \pm intervalo interquartilico. O processamento e a análise estatística dos dados foram realizados utilizando o *software* SPSS, versão 20 para *Windows* (SPSS INC., EUA).

6.3 Resultados

6.3.1 Ganho de Massa e Medidas Corporais

No início da fase de tratamento todos os grupos apresentavam média de massa corporal semelhante (controle: 24,85 \pm 0,53 g; probiótico: 24,66 \pm 0,30 g; antimicrobiano: 24,85 \pm 0,86 g; antimicrobiano+probiótico: 24,34 \pm 0,37 g; $p = 0,541$). Ao final das quatro semanas de tratamento, observou-se que os grupos antimicrobiano e antimicrobiano+probiótico apresentaram menor ganho de massa corporal em comparação ao grupo probiótico ($p \leq 0,001$) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Delta do ganho de massa corporal.

Fonte: elaborada pelo autor. Os valores são expressos como média \pm EP (n = 7). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos, segundo teste de ANOVA seguido do *post hoc* de Tukey.

Tal resultado representou uma redução de 5 e 7% no ganho de massa corporal nos grupos antimicrobiano e antimicrobiano+probiótico, respectivamente, em relação ao grupo probiótico.

Os perímetros abdominais e torácicos, bem como a razão entre esses perímetros e o comprimento focinho ânus, encontraram-se semelhantes entre os grupos ($p > 0,05$). Com relação ao índice de Lee, o grupo probiótico apresentou valores superiores aos grupos antimicrobiano e antimicrobiano+probiótico (Tabela 7).

Tais resultados sugerem que houve uma redução na quantidade de gordura armazenada pelos grupos antimicrobiano e antimicrobiano+probiótico e que essa redução não ocorreu em uma parte específica do corpo, como tórax ou abdômen.

Tabela 7 - Medidas corporais dos grupos experimentais.

Medidas Corporais	Controle	Probiótico	Antimicrobiano	Antimicrobiano + Probiótico	p
PA (cm) †	7,0±0,1	7,7±0,6	7,0±1,0	7,2±0,5	0,063
PT (cm) †	6,5±0,1	7,0±0,0	6,5±0,5	6,5±1,0	0,060
Razão PA/PT (cm)†	1,08±0,002	1,07±0,087	1,07±0,080	1,07±0,080	0,062
Comprimento (cm) †	9,0±0,0	9,0±0,1	9,0±0,5	9,0±0,5	0,070
Índice de Lee	0,331±0,004 ^a	0,327±0,001 ^a	0,314±0,004 ^b	0,324±0,003 ^b	0,002

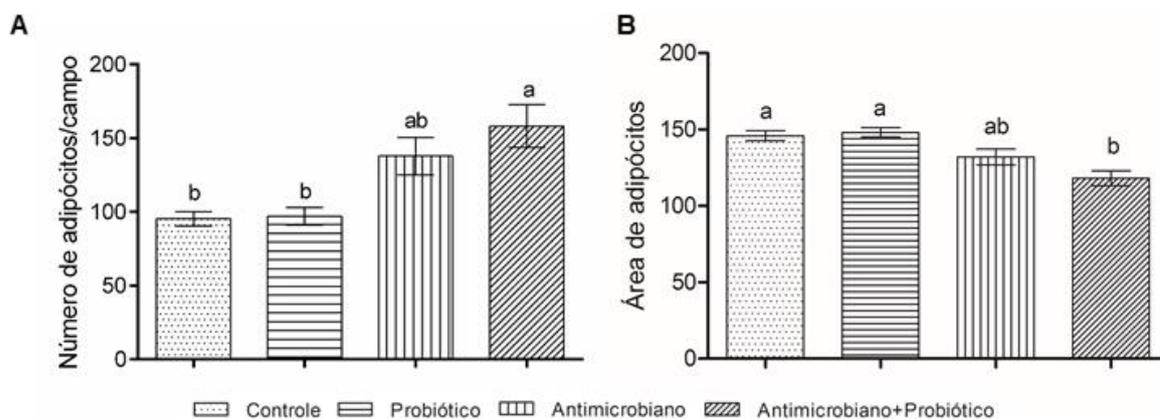
Fonte: elaborada pelo autor. valores são expressos como média ± EP ou †mediana ± intervalo interquartilico (n = 7). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p < 0,05) entre os grupos, segundo teste de ANOVA seguido do *post hoc* de Tukey ou †teste de Kruskal Wallis complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn's. PA: perímetro abdominal; PT: perímetro torácico.

6.3.2 Tecido Adiposo

A quantidade de tecido adiposo abdominal coletado durante a eutanásia dos animais foi superior (p ≤ 0,001) no grupo probiótico (0,19±0,006 g) em comparação aos grupos antimicrobiano (0,11±0,003 g) e antimicrobiano+probiótico (0,12±0,007 g).

A avaliação histológica desse tecido revelou que o grupo antimicrobiano+probiótico apresentava um maior número de adipócitos por campo em comparação ao grupo probiótico (p = 0,001; Gráfico 3A). Em contrapartida, o grupo antimicrobiano+probiótico apresentou adipócitos com menor área em comparação ao grupo probiótico (p ≤ 0,001; Gráfico 3B).

Tal resultado sugere que o maior número de células/campo observada no grupo antimicrobiano+probiótico seria consequência da redução da área ocupada pelos adipócitos em função da redução da quantidade de gordura armazenada por essa célula.

Gráfico 3 - Histologia do tecido adiposo abdominal.

Fonte: elaborada pelo autor. **A.** Número de adipócitos por campo. **B.** Área de adipócitos. Os valores são expressos como média \pm EP. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos, segundo teste de ANOVA seguido do *post hoc* de Tukey.

6.3.3 Consumo Alimentar, Hídrico e Calórico

Durante toda a fase de tratamento o consumo alimentar ($p = 0,124$), hídrico ($p = 0,065$) e calórico ($p = 0,875$) foram semelhantes entre os grupos experimentais (Apêndice C).

6.3.4 Saúde Intestinal

O teste de permeabilidade intestinal revelou que todos os grupos excretaram a mesma porcentagem de lactulose, e que o grupo antimicrobiano excretou uma menor porcentagem de manitol em comparação aos demais grupos. Quanto a porcentagem de excreção de lactulose e manitol constatou-se que os grupos excretavam quantidades semelhantes (Tabela 8).

Tabela 8 - Teste de permeabilidade intestinal.

Açúcares (%)	Controle	Probiótico	Antimicrobiano	Antimicrobiano+ Probiótico	p
Lactulose	1,66±0,17	1,66±0,09	1,90±0,18	1,53±0,21	0,54
Manitol	0,26±0,024 ^a	0,25±0,019 ^a	0,16±0,038 ^b	0,25±0,009 ^a	0,039
Razão L\M	6,88±0,81	6,69±0,74	6,48±0,93	6,19±1,01	0,98

Fonte: elaborada pelo autor. Os valores são expressos como média ± EP (n = 7). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p < 0,05) entre os grupos, segundo teste de ANOVA seguido do *post hoc* de Tukey. L: lactulose; M: manitol.

Esses resultados sugerem que os tratamentos não interferiram na permeabilidade intestinal, contudo, no grupo antimicrobiano parece ter ocorrido uma redução da área absortiva. Sendo, essa suspeita confirmada por meio da análise morfométrica do intestino delgado (Figura 7) a qual revelou que os grupos controle e probiótico apresentavam uma maior altura e largura de vilosidade em comparação aos grupos antimicrobiano e antimicrobiano+probiótico. Já a profundidade das criptas encontrava-se semelhante entre os grupos experimentais (Tabela 9).

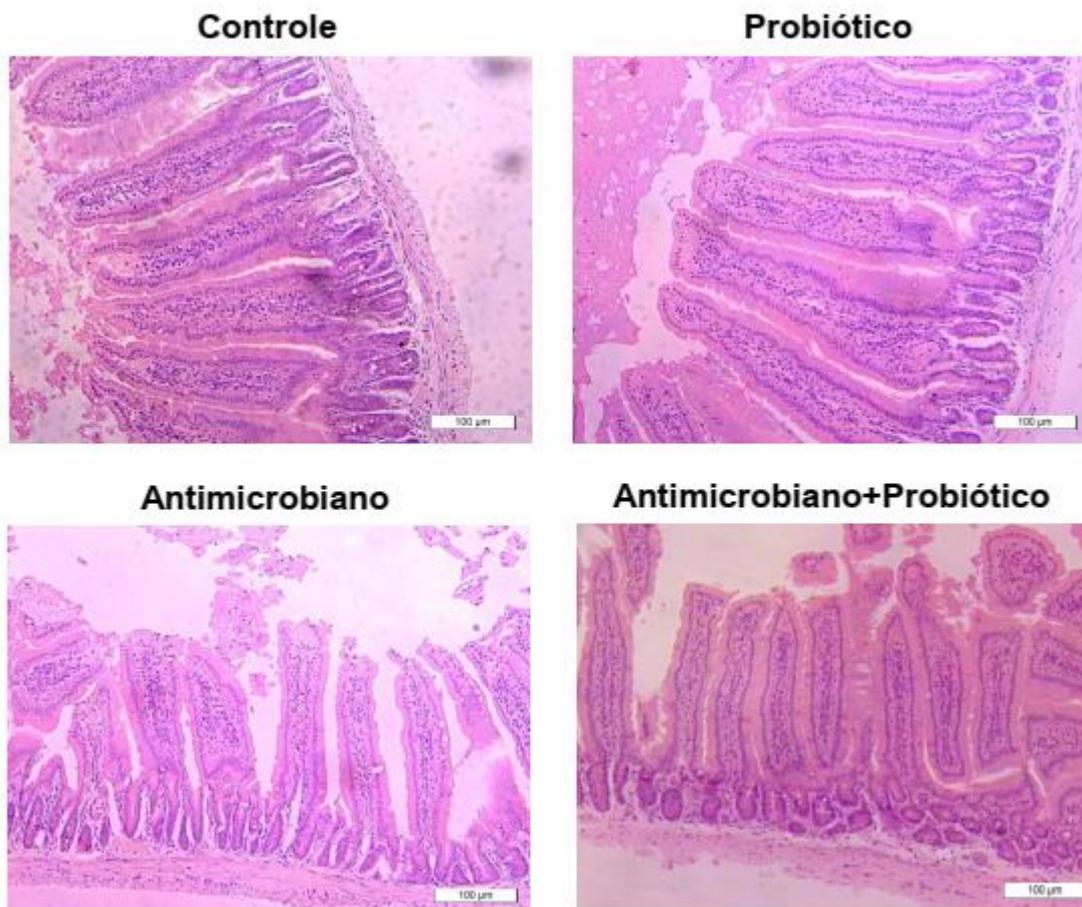
Tabela 9 - Morfometria do intestino delgado.

Morfometria (µm)	Controle	Probiótico	Antimicrobiano	Antimicrobiano + Probiótico	p
Altura	263,50±9,69 ^a	261,81±3,69 ^a	195,77±7,54 ^b	202,32±7,38 ^b	0,005
Largura	55,55±4,84 ^a	54,82±3,46 ^a	40,08±2,41 ^b	40,07±0,98 ^b	0,008
Profundidade	55,39±3,43	57,38±3,53	57,28±3,62	55,57±2,93	0,090

Fonte: elaborada pelo autor. Os valores são expressos como média ± EP (n = 7). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p < 0,05) entre os grupos, segundo teste de ANOVA seguido do *post hoc* de Tukey.

A expressão dos mediadores intestinais da resposta inflamatória, TLR4 (p = 0,432) e o MyD88 (p = 0,460) (Apêndice D), encontraram-se semelhantes entre os grupos experimentais, o que sugere que em todos os grupos experimentais o sistema imune intestinal encontrava-se ativado de forma semelhante.

Figura 7 - Fotomicrografia do intestino delgado dos grupos experimentais.

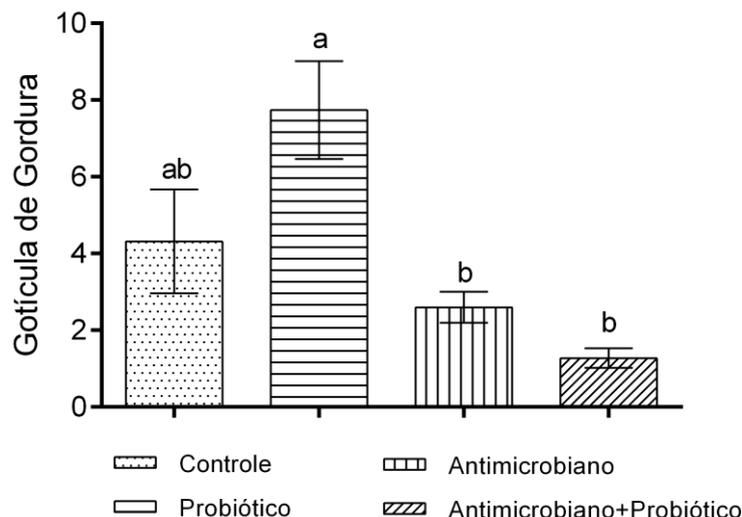


Fonte: elaborada pelo autor. Coloração de hematoxilina e eosina. Aumento de 100 X.

6.3.5 Saúde Hepática

A partir da pesagem do tecido hepático coletado durante a eutanásia observou-se que o grupo probiótico ($1,80 \pm 0,12$ g) exibiu valores superiores aos demais grupos experimentais (controle: $1,37 \pm 0,09$ g; antimicrobiano: $1,37 \pm 0,09$ g e antimicrobiano+probiótico: $1,49 \pm 0,07$ g; $p = 0,015$). Quanto ao índice hepatossomático, esse apresentou-se semelhante entre os grupos ($p = 0,052$) (dados não mostrados).

Por meio da análise histológica constatou-se que o grupo probiótico apresentava um maior número de gotículas de gordura no fígado em comparação aos grupos antimicrobiano e antimicrobiano+probiótico ($p = 0,007$) (Gráfico 4). Porém, a expressão das enzimas lipogênicas SREBP-1 ($p = 0,333$), acilCoA carboxilase ($p = 0,245$) e ácido graxo sintase ($p = 0,317$) encontraram-se semelhantes entre os grupos (Apêndice D).

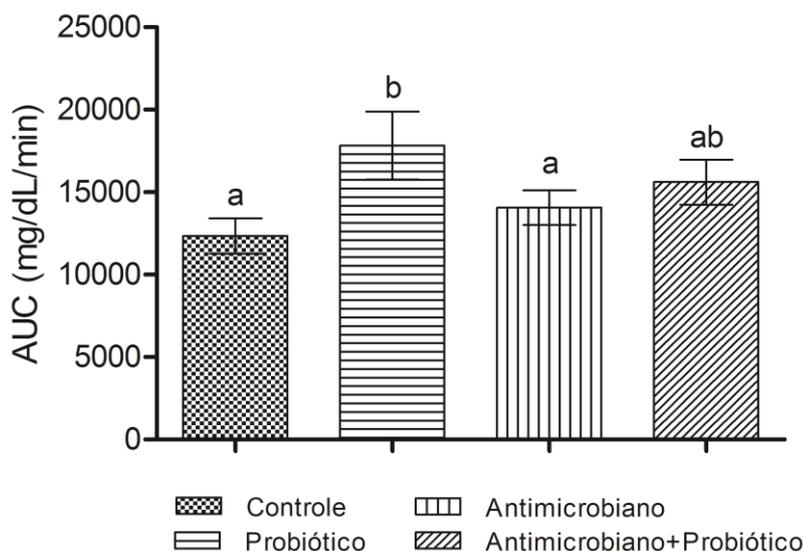
Gráfico 4 - Gotícula de gordura no tecido hepático.

Fonte: elaborada pelo autor. Os valores são expressos como média \pm EP (n = 7). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos, segundo teste de ANOVA seguido do *post hoc* de Tukey.

O número de núcleos picnóticos ($p = 0,325$) e de infiltrados inflamatórios ($p = 0,340$) foi semelhante entre os grupos experimentais, bem como a concentração sérica das enzimas AST e ALT (dados não mostrados). O que sugere que a quantidade de gordura armazenada no tecido adiposo do grupo probiótico não foi suficiente para lesionar o tecido.

6.3.6 Consequências Metabólicas

Ao avaliar a AUC obtida durante o TTOG, observou-se que o grupo probiótico exibiu AUC superior ao grupo antimicrobiano ($p = 0,015$; Gráfico 5), o que sugere que o metabolismo da glicose se encontrava alterado nesse grupo. Ainda, todos os grupos apresentaram expressão gênica semelhante do transportador intestinal de glicose SGLT-1 ($p = 0,482$; Apêndice D).

Gráfico 5 - Área abaixo da curva glicêmica.

Fonte: elaborada pelo autor. Os valores são expressos como média \pm EP (n = 7). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos, segundo teste de ANOVA seguido do *post hoc* de Tukey.

Quanto ao colesterol sérico e suas frações, constatou-se que todos os tratamentos apresentaram concentração sérica de colesterol superior ao grupo controle, sendo o grupo antimicrobiano o que mais diferiu (Tabela 10).

Fisiologicamente camundongos possuem uma concentração sérica de HDL-c superior as concentrações de LDL-c. No presente estudo, o grupo probiótico apresentou menor concentração de HDL-c em comparação aos grupos antimicrobiano e antimicrobiano+probiótico. Com relação ao LDL-c o grupo antimicrobiano+probiótico apresentou concentração sérica inferior aos grupos probiótico e antimicrobiano. A concentração de triglicerídeos apresentou-se semelhante entre os grupos experimentais (Tabela 10).

Tabela 10 - Colesterol sérico e frações.

Parâmetros	Controle	Probiótico	Antimicrobiano	Antimicrobiano + Probiótico	p
Colesterol total (mg/dL)	148,28±9,69 ^c	176,11±5,83 ^b	191,46±0,53 ^a	169,20±3,90 ^b	≤ 0,001
HDL-c (mg/dL)	78,09±4,63 ^b	84,66±2,50 ^b	99,39±2,99 ^a	97,53±4,27 ^a	≤ 0,001
LDL-c (mg/dL)	56,83±5,58 ^b	76,13±4,18 ^a	77,61±2,04 ^a	59,43±3,71 ^b	≤ 0,001
Triglicerídeos (mg/dL)	61,00±5,13	76,55±8,27	71,94±8,05	69,84±6,13	0,451

Fonte: elaborada pelo autor. valores são expressos como média ± EP (n = 7). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p < 0,05) entre os grupos, segundo teste de ANOVA seguido do *post hoc* de Tukey. LDL-c: lipoproteína de baixa densidade; HDL-c: lipoproteína de alta densidade.

6.4 Discussão

No presente estudo constatou-se que, enquanto o tratamento isolado com o probiótico contribuiu para o ganho de massa corporal, os grupos tratados com o antimicrobiano de forma isolada (grupo antimicrobiano) e conjugada (grupo antimicrobiano+probiótico) apresentaram uma redução do ganho de massa. Análises posteriores confirmaram que essa diferença deveu-se a um menor acúmulo de gordura no tecido adiposo dos animais tratados com o antimicrobiano de forma isolada e conjugada.

Para que aconteça uma redução na adiposidade corporal, é indispensável que ocorra um déficit energético (ABESO, 2016). Nesse sentido, no presente estudo constatou-se que o consumo calórico dos grupos foi semelhante, o que sugere que a modulação na composição da microbiota intestinal proporcionada pelos tratamentos pode ter influenciado a absorção e/ou o metabolismo energético, e conseqüentemente o ganho ou a perda de gordura corporal (BÄCKHED, 2011).

O que se espera do tratamento contínuo com um probiótico e/ou antimicrobiano sobre a composição da microbiota intestinal de um indivíduo com excesso de peso, é que esses proporcionem um “efeito eubiótico”, favorecendo uma possível modulação positiva na composição da microbiota, o que contribuiria para a redução ou inibição do ganho de gordura corporal (IANIRO et al., 2016).

Os resultados do presente estudo sugerem que o tratamento com *L. gasseri* pode não ter sido capaz de modular a composição da microbiota

intestinal de maneira a impedir que os animais continuassem a ganhar massa corporal. Sabe-se que o efeito modulatório dos probióticos sobre a microbiota intestinal é influenciado pelo tempo de intervenção (CROVESY et al., 2017). No presente estudo, optou-se por um tempo de intervenção de 4 semanas, uma vez que o objetivo era comparar os efeitos do tratamento com *L. gasseri* com os da ceftriaxona. Em função disso, foi necessário realizar um tempo de intervenção curto já que havia o risco (GUO et al., 2017) dos animais não sobreviverem ao tratamento com a ceftriaxona, uma vez que a dose utilizada (500 mg/kg) corresponde a uma superdose se comparada a utilizada no tratamento de doenças infecciosas em humanos (TRIAXTON®, Blau Farmacêutica S/A).

Além disso, no presente estudo o probiótico utilizado encontrava-se liofilizado e sabe-se que nessa forma os microrganismos podem necessitar de um tempo maior para restabelecer sua atividade e exercer suas funções ao atingirem a região intestinal (RIJKERS et al., 2010).

Os mecanismos utilizados pelas bactérias do gênero *Lactobacillus* para modular a composição da microbiota intestinal são complexos e multifacetados. Um desses mecanismos inclui a redução do pH intestinal proporcionada pelos ácidos (acético, propiônico e ácidos láctico) por elas produzidos a partir dos carboidratos presentes na dieta (DRISSI et al., 2017). Algumas estirpes de *L. gasseri* produzem uma substância com efeito antimicrobiano denominada lactocilina, a qual possui espectro de atuação maior contra bactérias patogênicas gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*) do que gram-negativas (*Escherichia coli*) (DONIA et al., 2014). Ainda, *L. gasseri* são produtores de diferentes tipos de bacteriocinas (PANDEY et al., 2013; PETERNEL et al., 2010; ROGELJ e MATIJAŠIĆ, 2006), as quais conferem vantagem competitiva, principalmente contra bactérias gram-positivas. Assim, a modulação proporcionada por *L. gasseri* seria contrária a exercida pelo antimicrobiano ceftriaxona, o qual possui espectro de atuação principal contra bactérias do tipo gram-negativas.

Quanto aos antimicrobianos, seu efeito modulatório é superior ao dos probióticos, uma vez que esses são a forma pura de um metabólico secundário produzido por alguns microrganismos que possui uma elevada capacidade bactericida (REBELLO e GASPARELLO, 2010). Aliado a isso, a indústria farmacêutica está constantemente modificando a estrutura desses compostos a fim de

potencializar seu efeito (PIDOT et al., 2014). No presente estudo, optou-se por um antimicrobiano com espectro de atuação principal contra bactérias gram-negativas (TRIAXTON®, Blau Farmacêutica S/A), tendo em vista que o lipolissacarídeo presente na parede celular dessas bactérias tem sido amplamente relacionado com o desenvolvimento do excesso de peso (CANI et al., 2007).

A magnitude do efeito do tratamento com um antimicrobiano sobre a microbiota intestinal é fortemente influenciada pela interdependência existente entre as diferentes espécies (BECATTINI et al., 2016). Nesse sentido, os antimicrobianos têm um grande impacto sobre a composição e funcionalidade da microbiota intestinal, podendo causar uma forte redução na diversidade microbiana ou de um táxon específico, além de estimular o desenvolvimento e a proliferação de microrganismos resistentes a ação de antimicrobianos (JERNBERG et al., 2007). Assim, considerando a definição de disbiose (LEVY et al., 2017), o tratamento com um antimicrobiano não proporcionaria um “efeito eubiótico”, mas sim outra disbiose.

Apesar de serem escassos os estudos que avaliaram o efeito da ceftriaxona sobre a composição da microbiota intestinal, o único estudo realizado constatou uma redução na diversidade microbiana e um aumento na população de bactérias do gênero *Clostridium* (GUO et al., 2017). A redução na diversidade microbiana tem sido fortemente associada ao aumento do risco para o desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais e do câncer colorretal (MATSUOKA e KANAI, 2017). Ainda, apesar de não ter sido identificada a espécie responsável pela expansão da população de *Clostridium*, destaca-se que uma das advertências presentes na bula desse medicamento incluem a diarreia associada a *Clostridium difficile*, a qual pode variar desde de diarreia leve à colite (TRIAXTON®, Blau Farmacêutica S/A). Além dessas alterações, Guo et al. (2017) constataram que o uso prolongado de ceftriaxona levou a um aumento das populações de *Enterococcus* e *Robinsoniella*, os quais são resistentes a ação desse antimicrobiano, e estão envolvidos na ocorrência de infecção hospitalar em pacientes imunocomprometidos.

Ainda são escassos os estudos onde o tratamento adjuvante para o excesso de peso se inicia com um antimicrobiano e continua com um probiótico. Nesse esquema de tratamento espera-se que dentre as bactérias eliminadas

pelo antimicrobiano encontrem-se aquelas relacionadas com o aumento da massa corporal, e posteriormente durante o tratamento com o probiótico, bactérias relacionadas com a redução do risco para o desenvolvimento dessa morbidade possam proliferar e recolonizar o intestino (DEL FIOLE et al., 2014). No presente estudo, é provável que o dano provocado pelo antimicrobiano não foi revertido com o uso do probiótico.

Com relação a absorção, a análise da permeabilidade intestinal revelou que o tratamento com o antimicrobiano de forma isolada levou a uma redução da absorção intestinal de manitol. Esse monossacarídeo é utilizado como marcador da permeabilidade intestinal transcelular, uma vez que esse açúcar é absorvido por meio de pequenos poros aquosos, de alta incidência presentes na membrana das células intestinais (TEIXEIRA et al., 2014). Assim, esse resultado sugere que os animais do grupo antimicrobiano possuem área de superfície intestinal reduzida (ARRIETA, BISTRITZ e MEDDINGS, 2006).

Corroborando com o resultado do teste de permeabilidade intestinal, a análise histológica revelou que o tratamento com o antimicrobiano de forma isolada e conjugada provocou uma redução na altura e na largura das vilosidades intestinais. Dessa forma, confirma-se que os animais tratados com o antimicrobiano de forma isolada ou conjugada apresentavam uma área absorptiva reduzida, o que teria contribuído para o menor ganho de massa corporal apresentado por esses grupos em comparação aos demais.

Em estudo realizado com camundongos BALB/c tratados com diferentes doses de ceftriaxona (100, 200 e 400 mg/mL durante 8, 30, 60, 90, 120 e 150 dias) observou-se que independentemente da dose ou da duração do tratamento houve um encurtamento das vilosidades intestinais desses animais em comparação ao grupo controle. Uma das consequências dessa menor área absorptiva foi a redução no ganho de massa corporal nesses animais (GUO et al., 2017). Assim, sugere-se que tal efeito seja droga-mediado, já que independentemente da dose e da duração do tratamento observa-se alterações na estrutura das vilosidades.

O efeito da ceftriaxona sobre a estrutura intestinal seria consequência de sua ação negativa sobre a modulação da composição da microbiota. Essa microbiota por sua vez hiperativaria o sistema imune local, o qual seria responsável pela efetiva destruição das vilosidades (GUO et al., 2017). No

presente estudo, constatou-se que a expressão gênica intestinal dos mediadores da resposta inflamatória desencadeada pela microbiota intestinal (TLR4 e MyD88) encontravam-se semelhantes entre os grupos experimentais. Contudo, tal resultado não descarta a atuação do sistema imune, uma vez que a depender da duração do tratamento, a resposta imune pode retornar a homeostasia (GUO et al., 2017).

O grupo probiótico apresentou um maior número de gotículas de gordura no fígado em comparação aos grupos antimicrobiano e antimicrobiano+probiótico. Esse resultado seria consequência do aumento da gordura corporal apresentados por esse grupo (MIKA e SLEDZINSKI, 2017). Tomando como base as concentrações séricas das enzimas AST e ALT, e o número de núcleos picnóticos e de infiltrado inflamatório no tecido hepático constatou-se que esse maior acúmulo de gordura hepática apresentada pelo grupo probiótico não foi suficiente para provocar lesões no tecido.

Quanto a absorção da glicose, no presente estudo observou-se que a expressão gênica intestinal do transportador SGLT-1 encontrava-se semelhante entre os grupos experimentais o que sugere que os animais apresentavam capacidade semelhante de absorver glicose (MEMBREZ et al., 2008).

Em relação ao metabolismo da glicose, constatou-se que o grupo probiótico apresentou AUC elevada em comparação aos grupos controle e antimicrobiano durante o TTOG. Esse efeito poderia ser consequência do aumento da gordura corporal, a qual elevaria a concentração sérica dos ácidos graxos livres, e esses, por sua vez estimulariam a produção e secreção de insulina pelo pâncreas. Porém, com o passar do tempo, esse estímulo constante passaria a inibir a produção da insulina, uma vez que levaria as células β -pancreáticas à exaustão. Além disso, os ácidos graxos livres interfeririam na interação da insulina com o seu receptor e na cascata de sinalização intracelular desencadeada por esse hormônio, o que levaria ao aumento das concentrações séricas de glicose (SAVAGE et al., 2007).

Quanto ao metabolismo dos lipídios, a expressão gênica das enzimas hepáticas SREBP-1, actilCoA carboxilase e ácido graxo sintase, que são as principais responsáveis pelo de síntese lipídica encontravam-se semelhantes entre os grupos. Com relação ao colesterol sérico e suas frações, os resultados

teriam sido influenciados pela adiposidade corporal dos animais (MIKA e SLEDZINSKI, 2017).

6.5 Conclusão

O tratamento com o antimicrobiano de forma isolada ou conjugada é capaz de proporcionar um menor acúmulo de gordura corporal. Contudo, quando se avalia o mecanismo utilizado por esse medicamento para que a perda de massa possa ocorrer, conclui-se que o benefício possui um risco elevado, o qual inclui a destruição das vilosidades intestinais, o que aumenta o risco para o desenvolvimento da doença inflamatória intestinal. Assim, com base nos resultados obtidos não recomenda-se que o antimicrobiano ceftriaxona seja utilizado no tratamento adjuvante do excesso de peso, devendo ser utilizado apenas no tratamento das doenças infecciosas.

Quanto ao tratamento isolado com o probiótico o mesmo não foi capaz de proporcionar uma perda de massa corporal, além de ter influenciado negativamente o metabolismo da glicose e ter contribuído para uma maior deposição de gordura no tecido hepático. É provável que o tempo de intervenção, o qual foi estabelecido com o objetivo de comparar os resultados obtidos com a ceftriaxona, não tenha sido suficiente para modular positivamente a composição da microbiota intestinal.

6.6 Referências Bibliográficas

ARRIETA, M. C.; BISTRITZ, L.; MEDDINGS, J. B. Alterations in intestinal permeability. **Gut**, v. 55, p. 1512–1515, 2006.

AUDA, S. H. et al. Preparation, physicochemical characterization and biological evaluation of cefodizime metal ion complexes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, p. 753-758, 2009.

BÄCKHED, F. Programming of host metabolism by the gut microbiota. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 58, n. 2, p. 44–52, 2011.

BACKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 44, p. 15718-15723, 2004.

BACKHED, F. et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 3, p. 979-984, 2007.

BECATTINI, S.; TAUR, Y.; PAMER, E. G. Antibiotic-induced changes in the intestinal microbiota and disease. **Cell Press Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 6, p. 458-478, 2016.

BORODY, T. J.; KHORUTS, A. Fecal microbiota transplantation and emerging applications. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology** v. 9, p. 88-96, 2012.

BRASIL. **Lei Nº 11794 de 8 de outubro de 2008**. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Brasília, DF, 2008.

BRUSAFERRO, A. et al. Is it time to use probiotics to prevent or treat obesity ? **Nutrients**, v. 10, n. 1613, p. 1-14, 2018.

CANI, P. D. et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 56, p. 1761–1772, 2007.

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

COX, A. J.; WEST, N. P.; CRIPPS, A. W. Obesity, inflammation, and the gut microbiota. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 3, n. 3, p. 207-215, 2015.

CROVESY, L. et al. Effect of *Lactobacillus* on body weight and body fat in overweight subjects: A systematic review of randomized controlled clinical trials. **International Journal of Obesity** v. 41, n. 11, p. 1607-1614, 2017.

DEL FIOL, F. D. S. et al. Obesity and the use of antibiotics and probiotics in rats. **Chemotherapy**, v. 60, p. 162-167, 2014.

DONIA, M. S. et al. A systematic analysis of biosynthetic gene clusters in the human microbiome reveals a common family of antibiotics. **Cell**, v. 158, n. 6, p. 1402-1414, 2014.

DORÉ, J.; BLOTTIÈRE, H. The influence of diet on the gut microbiota and its consequences for health. **Current Opinion in Biotechnology** v. 32, p. 195-199, 2015.

DRISSI, F.; RAOULT, D.; MERHEJ, V. Metabolic role of lactobacilli in weight modification in humans and animals. **Microbial Pathogenesis**, v. 106, p. 182-194, 2017.

FRIEDWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of concentration of low density lipoproteins separated by three different methods. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 18, p. 499-502, 1972.

GUO, Y. et al. Long-term use of ceftriaxone sodium induced changes in gut microbiota and immune system. **Scientific Reports**, v. 7, n. 43035, p. 1-9, 2017.

HILL, C. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology**, p. 1-9, 2014.

HOOPER, L. V. et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. **Science**, v. 291, n. 5505, p. 881-884, 2001.

HWANG, I. et al. Alteration of gut microbiota by vancomycin and bacitracin improves insulin resistance via glucagon-like peptide 1 in diet-induced obesity. **The FASEB Journal** v. 29, p. 1-15, 2015.

JENA, P. K. et al. Impact of targeted specific antibiotic delivery for gut microbiota modulation on high-fructose-fed rats. **Applied Biochemistry & Biotechnology**, p. 1-17, 2013.

JERNBERG, C. et al. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. **The ISME Journal**, v. 1, p. 56-66, 2007.

JIN, W. et al. Increased intestinal inflammatory response and gut barrier dysfunction in Nrf2-deficient mice after traumatic brain injury. **Cytokine**, v. 44, p. 135-140, 2008.

JUMPERTZ, R. et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, p. 58-65, 2011.

KANG, J.-H. et al. Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 in high-sucrose diet-induced obese mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2013.

KAWANO, M. et al. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 inhibits adipose tissue inflammation and intestinal permeability in mice fed a high-fat diet. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, n. 23, p. 1-9, 2016.

LEVY, M. et al. Dysbiosis and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, p. 219-232, 2017.

MATSUOKA, K.; KANAI, T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. **Seminars in immunopathology**, v. 37, p. 47-55, 2017.

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

MIKA, A.; SLEDZINSKI, T. Alterations of specific lipid groups in serum of obese humans a review. **Obesity Reviews**, v. 18, p. 247-272, 2017.

MIYOSHI, M. et al. Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 accompanied by inhibition of pro-inflammatory gene expression in the visceral adipose tissue in diet-induced obese mice. **European Journal of Nutrition**, v. 53, n. 2, p. 599-606, 2014.

MRESTANI, Y. et al. Influence of enhancers on the absorption and on the pharmacokinetics of cefodizime using *in-vitro* and *in-vivo* models. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 485-493, 2004.

PANDEY, N. et al. Gassericin A: a circular bacteriocin produced by Lactic acid bacteria *Lactobacillus gasseri*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, p. 1-11, 2013.

PETERNEL, M. Z. et al. Wide-inhibitory spectra bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* K7. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 2, p. 233-240, 2010.

PIDOT, S. J. et al. Antibiotics from neglected bacterial sources. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, p. 14-22, 2014.

RAJPAL, D. K. et al. Selective spectrum antibiotic modulation of the gut microbiome in obesity and diabetes rodent models. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1-19, 2015.

REBELLO, F. D. F.; GASPAR, A. Microorganismos e seus metabólitos utilizados na indústria de alimentos. **grogeoambiental**, p. 135-142, 2010.

REIS, S. A. D.; PELUZIO, M. D. C. G.; BRESSAN, J. The use of antimicrobials as adjuvant therapy for the treatment of obesity and insulin resistance: Effects and associated mechanisms. **Diabetes Metabolism Research Reviews**, v. 34, n. 6, p. 1-8, 2018.

RIJKERS, G. T. et al. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: Current status and recommendations for future research. **The Journal of Nutrition**, v. 140, p. 671–676, 2010.

ROGELJ, I.; MATIJAŠIĆ, B. B. *Lactobacillus gasseri* LF221 and K7: from isolation to application. **Institute of Molecular Biology - Slovak Academy of Sciences**, v. 61, n. 6, p. 761-769, 2006.

ROSA, D. D. et al. Flaxseed, olive and fish oil influence plasmatic lipids, lymphocyte migration and morphometry of the intestinal of Wistar rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 25, p. 275-280, 2010.
Sociedade Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica
Diretrizes brasileiras de obesidade 2016 / ABESO - **Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica**. – 4.ed. - São Paulo, SP.

SHI, L. et al. Effects of heat-inactivated *Lactobacillus gasseri* TMC0356 on metabolic characteristics and immunity of rats with the metabolic syndrome. **British Journal of Nutrition**, v. 109, p. 263-272, 2013.

STAPPENBECK, T. S.; HOOPER, L. V.; GORD, J. I. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 24, p. 15451-15455, 2002.

TEIXEIRA, T. F. S. et al. Intestinal permeability measurements: general aspects and possible pitfalls. **Nutrición Hospitalaria**, v. 29, n. 2, p. 269-281, 2014.

TRIAXTON® ceftriaxona dissódica hemieptaidratada. Blau Farmacêutica S/A. Bula de remédio.

VEDOVA, M. C. D. et al. A mouse model of diet-induced obesity resembling most features of human metabolic syndrome. **Nutrition and Metabolic Insights**, v. 9, p. 93-102, 2016.

WHO. **Global health observatory: Cancer mortality and morbidity 2016**.

WILLYARD, C. Drug-resistant bacteria ranked. **Nature**, v. 543, p. 15-15, 2017.

7 CONCLUSÃO GERAL

Apesar de ser um forte modulador da composição da microbiota intestinal, os efeitos do uso contínuo dos antimicrobianos como terapia adjuvante para o tratamento do excesso de peso não possui resultados conclusivos, principalmente em ensaios clínicos. Além disso, o uso regular dos antimicrobianos pode aumentar o risco para o desenvolvimento de microrganismos resistentes à sua ação, o que tem gerado preocupação mundial em função do risco de ascensão de doenças infecciosas tidas como controladas.

O presente estudo concluiu que a perda de gordura corporal observada nos animais tratados com ceftriaxona deveu-se a destruição das vilosidades intestinais, o que aumenta o risco para o desenvolvimento da doença inflamatória intestinal. Dessa forma, a ceftriaxona não deve ser utilizada no tratamento adjuvante do excesso de peso.

Quanto ao tratamento isolado com *L. gasseri* constatou-se que o mesmo não foi capaz de proporcionar uma perda de massa corporal, além de ter influenciado negativamente o metabolismo da glicose e ter contribuído para uma maior deposição de gordura no tecido hepático.

É provável que por estar na forma liofilizada, o tempo de intervenção com o probiótico não tenha sido suficiente para que o mesmo conseguisse colonizar e modular a microbiota intestinal. Assim, uma das limitações do presente estudo foi o tempo de intervenção com o probiótico, o qual foi estabelecido com o objetivo de comparar os resultados dessa intervenção com os obtidos no tratamento com a ceftriaxona. Sendo, em função do risco dos animais não resistirem a um logo tratamento com a dose de ceftriaxona (500mg/kg), que foi estabelecido que os tratamentos teriam duração de 4 semanas.

Novos estudos devem ser realizados com a finalidade de investigar o potencial uso de outros moduladores, tais como outras estirpes de probióticos e prebióticos, bem como combinações desses, cujo uso contínuo não traga riscos à saúde no tratamento adjuvante do excesso de peso e suas alterações metabólicas secundárias.

APÊNDICE A - CÁLCULO AMOSTRAL

Fórmula proposta por Mera et al. (1998): $N = \frac{2 \times (\alpha/2 \times DP)^2}{E^2}$

Na qual:

$\alpha/2$ = Valor da tabela de distribuição t (*two-tailed*)

DP = desvio padrão

E = diferença que se deseja detectar no estudo

Valores de referência do estudo de Miyoshi et al. (2014)			
	Grupo controle	Grupo tratado	Média ± DP
Peso (g)	39,15 ± 2,18	35,48 ± 2,26	37,315 ± 2,22
N	9	10	-

Fonte: elaborada pelo autor.

Valor de $\alpha/2$ é igual a 2,998 considerando um poder estatístico de 99%

$N = \frac{2 \times (2,998 \times 2,22)^2}{3,67^2}$ $n = 6,57 \approx 7$ animais por grupo

APÊNDICE B - SEQUÊNCIA DE *PRIMERS* UTILIZADOS

Gene	Forward	Reverse
AcetilCoA carboxilase-1	TGTTGAGACGCTGGTTTGTAGAA	GGTCCTTATTATTGTCCCAGACGTA
Ácido graxo sintase	CCCCTCAAGTGCACAGTGTTT	AGTGTTTCCCCTGAGCCATGTA
SREBP-1	GGAGCCATGGATTGCACATT	AGGAAGGCTTCCAGAGAGGA
SGLT-1	GCGTCATCACCATCTTGATCA	ACAGGTGCACGTCTGGAATG
TLR-4	CCAGAGTTTTTCCCCAGGAAGT	TCTCCACAGCCACCAGATTCT
MyD88	ATTGCCAGCGAGCTAATTGAG	TCAGGGCAGGGACAAAGCCTTGGCAA
RPL	AAAGGAAGAGTCGGAGGAATCAG	TGGCGGGATTAGTCGAAGAG

Fonte: elaborada pelo autor. Abreviações: RPL: *ribosomal protein L*; SGLT1: transportador sódio/glicose 1; SREBP-1: *sterol responsive element binding protein 1*; TLR4: *toll-like receptor 4*.

APÊNDICE C - CONSUMO ALIMENTAR, HÍDRICO E CALÓRICO

Consumo	Controle	Probiótico	Antimicrobiano	Antimicrobiano + Probiótico	p
Alimentar (g/dia)	4,77±0,52	5,09±0,32	5,00±0,42	5,11±0,46	0,390
Hídrico (mL/semana)	17,68±1,03	19,17±2,97	17,07±1,01	18,57±1,07	0,560
Calórico (kcal/dia)	35,58±1,41	34,49±1,66	35,15±1,73	35,48±1,11	0,702

Fonte: elaborada pelo autor. Os valores são expressos como média ± EP (n = 7). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos, segundo teste de ANOVA seguido do *post hoc* de Tukey.

APÊNDICE D - EXPRESSÃO GÊNICA HEPÁTICA E INTESTINAL

Genes	Controle	Probiótico	Antimicrobiano	Antimicrobiano + Probiótico	p
AcetilCoA carboxilase-1	28,53±1,80	28,24±1,81	27,97±1,99	30,45±1,74	0,245
Ácido graxo sintase	30,10±1,75	27,35±1,85	27,55±1,19	27,76±2,31	0,317
SREBP-1	14,60±1,50	16,70±1,20	15,21±2,20	17,85±2,9	0,333
SGLT-1	16,76±2,30	14,57±5,90	14,91±4,17	15,83±3,79	0,482
TLR-4	24,52±2,18	21,29±2,96	23,35±1,97	22,93±1,16	0,432
MyD88	28,82±2,34	27,24±3,34	27,43±3,14	29,15±2,47	0,460

Fonte: elaborada pelo autor. Os valores são expressos como média \pm EP (n = 7). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p < 0,05) entre os grupos, segundo teste de ANOVA seguido do *post hoc* de Tukey.

ANEXO A - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 09/2017, intitulado "Efeito do tratamento com antimicrobiano ou probiótico sobre parâmetros associados com a obesidade e a resistência insulínica em modelo animal", coordenado pela professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio do Departamento de Nutrição e Saúde, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 09/05/2017, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 09/2017, named "Effect of antimicrobial or probiotic treatment on parameters associated with obesity and insulin resistance in animal model", is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on May 09, 2017 valid for 12 months.


Prof. Atina Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV