

**Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

**Terapia personalizada com consórcio de  
bactérias fecais para o tratamento da  
obesidade**

**Jaqueline Cristina Galiardo**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Alimentos e Nutrição para obtenção  
do título de Mestre em Alimentos e  
Nutrição.

Área de concentração: Ciências  
Nutricionais

Orientador(a): Profa. Dra. Daniela  
Cardoso Umbelino Cavallini

Araraquara  
2022

# **Terapia personalizada com consórcio de bactérias fecais para o tratamento da obesidade**

**Jaqueline Cristina Galiardo**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Alimentos e Nutrição para obtenção  
do título de Mestre em Alimentos e  
Nutrição.

Área de concentração: Ciências  
Nutricionais

Orientador(a): Profa. Dra. Daniela  
Cardoso Umbelino Cavallini

Araraquara  
2022

**G156t**

Galiardo, Jaqueline Cristina.

Terapia personalizada com consórcio de bactérias fecais para o tratamento da obesidade / Jaqueline Cristina Galiardo. – Araraquara: [S.n.], 2022.  
98 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos, Nutrição e Engenharia de alimentos. Área de Concentração em Ciências Nutricionais.

Orientadora: Daniela Cardoso Umbelino Cavallini.

1. Obesidade. 2. Probiótico personalizado. 3. Microbiota intestinal. 4. Antibiótico. 5. Transplante de microbiota fecal. I. Cavallini, Daniela Cardoso Umbelino, orient. II. Título.

## **CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** Terapia personalizada com consórcio de bactérias fecais para o tratamento da obesidade

**AUTORA:** JAQUELINE CRISTINA GALIARDO

**ORIENTADORA:** DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Alimentos e Nutrição, área: Ciências Nutricionais pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI (Participação Virtual)  
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP Araraquara

Profa. Dra. RAQUEL BEDANI (Participação Virtual)  
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da / Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

Dra. LARISSA SBAGLIA CELIBERTO (Participação Virtual)  
University of British Columbia

Araraquara, 16 de dezembro de 2022

À Deus, por ser meu verdadeiro amigo, e sempre guiar meus passos.

Aos meus pais Luis Carlos e Sheila, por todo carinho, apoio, paciência e por sempre estarem ao meu lado, nunca medindo esforços para tanto.

A minha irmã Hillary por iluminar meus dias, ser minha companheira e minha maior motivação.

Ao Gabriel, por todo companheirismo, compreensão e amor. Sua ajuda foi fundamental durante toda a realização desse trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processo nº 2019/139420.

À minha orientadora Profa. Dra. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini, pela confiança, paciência, ensinamentos e incentivo durante todas as etapas da pesquisa.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), Araraquara; pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação para obtenção do título de Mestre.

Ao Adriano Ferreira Luiz, Josiane Márcia Maria Canaan e Roseli Aparecida Pinto; por todos os ensinamentos, contribuições e amizade durante as atividades desenvolvidas no Laboratório de Pesquisa em Probióticos (Departamento de Ciências Biológicas) da UNESP, FCF, Araraquara.

Aos companheiros de laboratório, Amanda Ascanio, Eliane Vale da Silva, Maria Jara Montibeller e Yago Bianchi Peres; pela amizade e colaboração durante o desenvolvimento da pesquisa.

À Profa. Dra. Amanda Martins Baviera e a discente Ingrid Delbone Figueiredo, do Departamento de Análises Clínicas da UNESP, FCF, Araraquara; pelo auxílio nas análises bioquímicas.

À Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros e ao discente Breno Vilas Boas Raimundo, do Departamento de Ciências Biológicas da UNESP, FCF, Araraquara; pelo auxílio nas análises imunológicas.

Ao Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio e ao técnico José Antônio Zuanon do Departamento de Fisiologia e Patologia da UNESP, Faculdade de Odontologia, Araraquara; pelos ensinamentos e orientações nas análises histológicas.

Ao Celso Luiz Borsato (Biotério Central - UNESP, FCF, Araraquara) e a veterinária Gabriela Maria Ferreira de Campos, pela ajuda e ensinamentos.

À Camila Cesario Fernandes Sartini do Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental do Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica para sequenciamento de DNA da UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Jaboticabal; por colaborar com as análises de sequenciamento de DNA.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

## RESUMO

A ingestão de probióticos tem sido utilizada para modificar de forma benéfica a microbiota intestinal de indivíduos portadores de algumas doenças crônicas. Entretanto, essa abordagem apresenta resultados discrepantes e limitações, relacionados à resiliência da microbiota intestinal e à individualidade genética do paciente, que parecem interferir na efetividade dos probióticos. **Objetivo:** avaliar o efeito da terapia personalizada com consórcio de bactérias fecais na redução do risco da obesidade e suas consequências em modelo animal. **Métodos:** as cepas para o tratamento personalizado foram previamente isoladas de material fecal de crianças e armazenadas em um banco de células. O estudo foi conduzido com camundongos Swiss, livres de patógenos específicos, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: Controle (C) (n=10), Obeso (OB) (n=10), Obeso + Probiótico Personalizado (OPP) (n=15), Obeso + Cepas Compartilhadas (OCC) (n=13). Inicialmente, os animais receberam um coquetel de antibióticos para depletar a microbiota intestinal e, posteriormente, foram recolonizados com a microbiota fecal dos doadores das cepas personalizadas, via transplante de microbiota fecal. A obesidade foi induzida por dieta hiperlipídica e o estudo teve duração de 120 dias. As cepas previamente isoladas e armazenadas no banco de células foram utilizadas para o tratamento dos animais dos grupos OPP e OCC (8 log UFC/dia), a partir do T85. A evolução da obesidade foi avaliada pela variação ponderal, coeficiente de eficácia alimentar, perfil lipídico e de citocinas, área e diâmetro dos adipócitos e análise da composição da microbiota fecal. **Resultados:** A depleção da microbiota intestinal causou perda de peso acentuada ( $p < 0,05$ ) e o transplante de microbiota fecal foi capaz de reverter o quadro de emagrecimento, levando à recuperação do peso corporal ( $p > 0,05$ ). A partir da sétima semana do estudo (T71), os animais induzidos à obesidade exibiram ganho de peso superior ao do controle, alimentado com dieta convencional e os animais que receberam as cepas personalizadas (OPP) apresentaram variação ponderal semelhante ao do controle (C) na terceira semana de tratamento (T99 e T106). A ingestão das cepas personalizadas também melhorou o perfil lipídico dos animais, que exibiram níveis de não HDLc semelhantes aos dos animais não induzidos à obesidade ( $p > 0,05$ ). A análise histológica evidenciou que o tratamento com as cepas personalizadas minimizou o aumento da área e diâmetro dos adipócitos ( $p < 0,05$ ), reestabeleceu o equilíbrio entre os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* e aumentou a proporção de *Akkermansia* spp. **Conclusão:** A recolonização da microbiota intestinal com o uso do transplante de microbiota fecal reverteu a disbiose intestinal, o prolapso retal e a perda de peso observada após o uso de antibióticos. A administração das cepas personalizadas durante cinco semanas sugeriu efeito benéfico no controle do ganho de peso na terceira semana de tratamento e melhorou o perfil lipídico dos animais. Além disso, o tratamento personalizado foi capaz de modular benéficamente a microbiota intestinal e minimizar a hipertrofia do tecido adiposo branco epididimal, sinalizando para seu potencial uso no controle da obesidade.

**Palavras-chave:** Obesidade; Probiótico personalizado; Microbiota intestinal; Antibiótico; Transplante de microbiota fecal.

## ABSTRACT

The intake of probiotics has been used to beneficially modify the intestinal microbiota of individuals with some chronic diseases. However, this approach presents discrepant results and limitations, related to the resilience of the intestinal microbiota and the genetic individuality of the patient, which seem to interfere in the effectiveness of probiotics. **Aim:** evaluate the effect of personalized therapy with fecal bacteria consortium in reducing the risk of obesity and its consequences in animal model. **Methods:** the strains for personalized treatment were previously isolated from children's fecal material and stored in a cell bank. The study was conducted with Swiss mice, specific pathogen free, randomly distributed into four groups: Control (C) (n=10); Obese (OB) (n=10); Obese + Personalized Probiotic (OPP) (n=15), Obese + Shared Strains (OCC) (n=13). Initially, the animals received a cocktail of antibiotics to deplete the intestinal microbiota and were subsequently recolonized with the donor fecal microbiota of the customized strains, via fecal microbiota transplantation. Obesity was induced by a high-fat diet and the study lasted 120 days. The strains previously isolated and stored in the cell bank were used for the treatment of animals from groups OPP and OCC (8 log CFU/day), from T85. The evolution of obesity was evaluated by weight variation, coefficient of food efficacy, lipid and cytokine profile, area and diameter of adipocytes and analysis of fecal microbiota composition. **Results:** The depletion of the intestinal microbiota caused marked weight loss ( $p<0.05$ ) and fecal microbiota transplantation was able to reverse the weight loss, leading to recovery of body weight ( $p>0.05$ ). From the seventh week of the study (T71), the animals induced to obesity exhibited weight gain higher than the control, fed with conventional diet and the animals that received the personalized strains (OPP) presented weight variation similar to the control (C) in the third week of treatment (T99 and T106). The intake of the personalized strains also improved the lipid profile of the animals, which exhibited non-HDLc levels similar to those animals not induced to obesity ( $p>0.05$ ). Histological analysis showed that treatment with customized strains minimized the increase in adipocytes area and diameter ( $p<0.05$ ), reestablished the balance between *Firmicutes* and *Bacteroidetes* and increased the proportion of *Akkermansia* spp. **Conclusion:** The recolonization of the intestinal microbiota with the use of fecal microbiota transplantation reversed intestinal dysbiosis, rectal prolapse and weight loss observed after antibiotic use. The administration of customized strains for five weeks suggested a beneficial effect on weight gain control in the third week of treatment and improved the lipid profile of the animals. In addition, the personalized treatment was able to beneficially modulate the intestinal microbiota and minimize hypertrophy of epididymal white adipose tissue, signaling its potential use in the control of obesity.

**Keywords:** Obesity; Personalized probiotic; Intestinal microbiota; Antibiotic; Fecal microbiota transplant.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                                |                                                          |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------|
| <b>AGCC</b>                    | Ácidos graxos de cadeia curta                            |
| <b>ANOVA</b>                   | Análise de variância                                     |
| <b>ATB</b>                     | Antibióticos                                             |
| <b>C</b>                       | Controle                                                 |
| <b>CEP</b>                     | Comitê de Ética em Pesquisa                              |
| <b>CEUA</b>                    | Comissão de Ética no Uso de Animais                      |
| <b>CPPA</b>                    | Centro de Pesquisa e Produção de Animais                 |
| <b>CT</b>                      | Colesterol total                                         |
| <b>DNA</b>                     | Ácido desoxirribonucleico                                |
| <b>DSS</b>                     | <i>Dextran Sulfato de Sódio</i>                          |
| <b>EA</b>                      | Eficiência alimentar                                     |
| <b>ELISA</b>                   | <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>                 |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Fator de necrose tumoral- $\alpha$                       |
| <b>FCF</b>                     | Faculdade de Ciências Farmacêuticas                      |
| <b>F</b>                       | Forward                                                  |
| <b>GLP-1</b>                   | Glucagon-like peptide-1                                  |
| <b>HDLc</b>                    | HDL colesterol                                           |
| <b>IBTEC</b>                   | Instituto de Biotecnologia                               |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>  | Interleucina-1 $\beta$                                   |
| <b>IL-10</b>                   | Interleucina-10                                          |
| <b>LPS</b>                     | Lipopolissacarídeo                                       |
| <b>OB</b>                      | Obeso                                                    |
| <b>OCC</b>                     | Obeso + Cepas Compartilhadas                             |
| <b>OPP</b>                     | Obeso + Probiótico Personalizado                         |
| <b>PBS</b>                     | <i>Phosphate-Buffered Saline</i>                         |
| <b>PF</b>                      | Peso final                                               |
| <b>PI</b>                      | Peso inicial                                             |
| <b>QIIME</b>                   | <i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i>      |
| <b>RT-PCR</b>                  | Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real             |
| <b>R</b>                       | <i>Reverse</i>                                           |
| <b>rRNA</b>                    | RNA ribossomal                                           |
| <b>SPF</b>                     | <i>Specific Pathogen Free</i>                            |
| <b>SPSS</b>                    | <i>Statistical Package for the Social Science</i>        |
| <b>T</b>                       | Tempo em dias                                            |
| <b>TG</b>                      | Triglicerídeos                                           |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b>  | Tator de crescimento transformador- $\beta$              |
| <b>UNESP</b>                   | Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” |
| <b>VET</b>                     | Valor energético total                                   |
| <b>www</b>                     | <i>World Wide Web</i>                                    |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                         |                                   |
|-------------------------|-----------------------------------|
| <b>log</b>              | logaritmo                         |
| <b>Kg/m<sup>2</sup></b> | quilograma por metro quadrado     |
| <b>%</b>                | percentual                        |
| <b>mg/mL</b>            | miligrama por mililitro           |
| <b>μL/g</b>             | microlitro por grama              |
| <b>μL</b>               | microlitro                        |
| <b>g</b>                | grama                             |
| <b>mL</b>               | mililitro                         |
| <b>mm</b>               | milímetro                         |
| <b>g</b>                | força gravitacional               |
| <b>min</b>              | minuto                            |
| <b>C</b>                | celsius                           |
| <b>g/Kcal</b>           | grama por quilocaloria            |
| <b>Kcal/g</b>           | quilocaloria por grama            |
| <b>mg</b>               | miligrama                         |
| <b>mg/kg</b>            | miligrama por quilograma          |
| <b>h</b>                | hora                              |
| <b>GL</b>               | Gay-Lussac                        |
| <b>g/g</b>              | grama por grama                   |
| <b>mg/dL</b>            | miligrama por decilitro           |
| <b>μm<sup>2</sup></b>   | micrómetro quadrado               |
| <b>μm</b>               | micrómetro                        |
| <b>pg/mg de tecido</b>  | picograma por miligrama de tecido |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                        | Página |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Tabela 1. Composição nutricional da dieta hiperlipídica oferecida aos animais em estudo, para indução da obesidade.    | 38     |
| Tabela 2. Pools de cepas utilizadas no tratamento oferecido aos animais dos grupos OPP (tratamento personalizado).     | 40     |
| Tabela 3. Pools de cepas utilizadas no tratamento oferecido aos animais dos grupos OCC (tratamento não personalizado). | 41     |
| Tabela 4. Consumo alimentar e CEA durante o protocolo de indução da obesidade.                                         | 55     |
| Tabela 5. Glicemia de jejum (T85 e T120) (mg/dL) dos animais dos diferentes grupos experimentais.                      | 56     |
| Tabela 6. Níveis de lipídeos plasmáticos (mg/dL) dos animais dos diferentes grupos experimentais.                      | 59     |
| Tabela 7. Peso total do tecido adiposo epididimal e retroperitoneal dos diferentes grupos experimentais.               | 61     |
| Tabela 8. Área e diâmetro do tecido adiposo epididimal dos diferentes grupos experimentais.                            | 63     |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                              | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 1. Esquema do protocolo experimental para o estudo da obesidade.                                                                                      | 35     |
| Figura 2. Variação ponderal dos animais dos diferentes grupos experimentais, durante as etapas de depleção da microbiota intestinal e recolonização por TMF. | 49     |
| Figura 3. Imagem macroscópica dos animais após a depleção da microbiota intestinal pela administração do coquetel de ATB.                                    | 51     |
| Figura 4. Variação ponderal dos animais dos diferentes grupos experimentais, durante o protocolo de indução da obesidade.                                    | 52     |
| Figura 5. Imagem da região intra-abdominal dos animais dos diferentes grupos experimentais.                                                                  | 61     |
| Figura 6. Fotomicrografia do tecido adiposo epididimal dos diferentes grupos experimentais.                                                                  | 64     |
| Figura 7. Concentração de citocinas do tecido adiposo retroperitoneal dos diferentes grupos experimentais.                                                   | 67     |
| Figura 8. Abundância relativa dos filos em relação às bactérias totais presentes nas fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais.                  | 75     |
| Figura 9. Abundância relativa dos gêneros em relação às bactérias totais presentes nas fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais.                | 76     |

## Sumário

|                                                                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                            | <b>18</b> |
| <b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                                                                                  | <b>22</b> |
| 2.1 <i>Obesidade .....</i>                                                                                           | 22        |
| 2.2 <i>Estratégias para modulação da microbiota intestinal .....</i>                                                 | 25        |
| <b>3 OBJETIVOS.....</b>                                                                                              | <b>31</b> |
| 3.1 <i>Objetivo Geral .....</i>                                                                                      | 31        |
| 3.2 <i>Objetivos Específicos .....</i>                                                                               | 31        |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                                                    | <b>32</b> |
| 4.1 <i>Material .....</i>                                                                                            | 32        |
| 4.2 <i>Coleta de amostras fecais das crianças para o TMF e isolamento das cepas potencialmente probióticas .....</i> | 32        |
| 4.3 <i>Animais .....</i>                                                                                             | 32        |
| 4.4 <i>Protocolo experimental .....</i>                                                                              | 34        |
| 4.4.1 <i>Depleção da microbiota intestinal pela administração de ATB.....</i>                                        | 36        |
| 4.4.2 <i>Recolonização da microbiota intestinal pela administração do TMF ...</i>                                    | 36        |
| 4.4.3 <i>Indução da obesidade .....</i>                                                                              | 37        |
| 4.4.4 <i>Tratamentos Personalizado e Cepas Compartilhadas .....</i>                                                  | 38        |
| <b>5 COLETA DE AMOSTRAS E EUTANÁSIA.....</b>                                                                         | <b>42</b> |
| 5.1 <i>Métodos .....</i>                                                                                             | 43        |
| 5.1.1 <i>Variação ponderal .....</i>                                                                                 | 43        |
| 5.1.2 <i>Determinação do coeficiente de eficácia alimentar (CEA) .....</i>                                           | 43        |
| 5.1.3 <i>Glicemia de jejum.....</i>                                                                                  | 44        |
| 5.1.4 <i>Determinação de CT e frações .....</i>                                                                      | 44        |
| 5.1.5 <i>Análise histológica da gordura intra-abdominal.....</i>                                                     | 44        |
| 5.1.6 <i>Determinação de citocinas .....</i>                                                                         | 45        |
| 5.1.7 <i>Determinação da composição da microbiota fecal .....</i>                                                    | 45        |
| <b>6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....</b>                                                                     | <b>46</b> |
| <b>7 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                                | <b>47</b> |
| 7.1 <i>Depleção e recolonização da microbiota intestinal .....</i>                                                   | 47        |
| 7.2 <i>Indução da Obesidade e Administração dos Tratamentos.....</i>                                                 | 52        |
| 7.3 <i>Consumo alimentar e CEA.....</i>                                                                              | 54        |

|                                                                 |           |
|-----------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>7.4 Glicemia de jejum.....</i>                               | <i>56</i> |
| <i>7.5 Determinação de CT e frações .....</i>                   | <i>57</i> |
| <i>7.6 Avaliação do tecido adiposo.....</i>                     | <i>60</i> |
| <i>7.7 Determinação de citocinas .....</i>                      | <i>66</i> |
| <i>7.8 Determinação da composição da microbiota fecal .....</i> | <i>69</i> |
| <b>8 CONCLUSÃO .....</b>                                        | <b>77</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                        | <b>78</b> |
| <b>Anexos .....</b>                                             | <b>93</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal “é uma comunidade de microrganismos que se desenvolve sob influências genéticas, ambientais, dietéticas e de doenças” estando envolvida em diferentes enfermidades (TAPPENDEN, 2018). Seu desenvolvimento e colonização são iniciados principalmente no parto, pois ao nascer, a criança tem seu primeiro contato com os microrganismos do meio exterior, que influenciarão na composição da microbiota intestinal infantil (MILANI et al., 2017). A forma de nascimento é um fator importante, pois, crianças que nascem de parto cesariano apresentam uma microbiota intestinal menos diversificada e estão mais propensas a desenvolverem obesidade e infecções respiratórias, em comparação àquelas que nascem de parto normal (MURATA et al., 2020).

Apesar da microbiota ser considerada resiliente, hábitos alimentares, estilo de vida e fatores genéticos estão envolvidos na variação da sua composição e funcionalidade. Ao longo da vida, inúmeros fatores podem interferir na composição da microbiota intestinal, incluindo estresse, ingestão frequente de bebidas alcoólicas, tabagismo, uso de medicamentos, local de moradia e poluentes atmosféricos (REDONDO-USEROS et al., 2020).

A microbiota intestinal é responsável pela regulação de diversos processos metabólicos e age de forma individualizada frente às mudanças dos hábitos alimentares e estilo de vida, além de possuir inerentes relações e associações com o desenvolvimento da obesidade, dislipidemia, acúmulo de gordura em tecido não adiposo (gordura ectópica), doença hepática

gordurosa não alcoólica e aterosclerose (JONSSON; BÄCKHED, 2017; CUEVAS-SIERRA et al., 2019; SCHOELER; CAESAR, 2019).

A obesidade é uma doença metabólica multifatorial, definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) “como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura que afeta a saúde humana” (WHO, 2021). Ademais, dietas com teores elevados de carboidratos simples e lipídios, que favorecem o ganho de peso, também afetam a composição da microbiota intestinal, deixando-a com menores proporções de *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Akkermansia* spp. e maiores de *Firmicutes*, *Prevotella* spp. e *Methanobrevibacter* spp. (AMABEBE et al., 2020).

Dentre as estratégias utilizadas para modular a microbiota intestinal, e auxiliar no tratamento de doenças relacionadas à disbiose estão o uso de antibiótico (ATB), o transplante de microbiota fecal (TMF) e probióticos (ROHLKE; SURAWICZ; STOLLMAN, 2010; PAMER, 2014; BOULANGÉ et al., 2016; RAMIREZ, 2017). Tratamentos realizados com ATB podem auxiliar na modulação da microbiota intestinal, mas também podem causar resistência antimicrobiana e disbiose, por isso devem ser utilizados com cautela (RIZZATTI; IANIRO; GASBARRINI, 2018). Outra estratégia utilizada na modulação da microbiota intestinal é o TMF, que consiste em transferir as fezes de um doador saudável para outro indivíduo, portador de alguma doença (CAMMAROTA et al., 2017). Esta técnica gera questionamentos por ser invasiva, pela possibilidade de alteração metabólica; transmissão de infecções ocultas e, principalmente, pela possibilidade de inoculação de

bactérias patogênicas ou resistentes a ATB no receptor (VRIEZE et al., 2013; XIAO et al., 2018; DEFILIPP et al., 2019).

Os probióticos vêm sendo cada vez mais utilizados com o objetivo de modular a microbiota intestinal, em função dos seus efeitos benéficos e segurança (KIM et al., 2019). Entretanto, o efeito dos probióticos são muitas vezes inconsistentes, com alguns pacientes respondendo de forma satisfatória e outros não. Esse efeito pode ser atribuído à resiliência da microbiota e a fatores genéticos que interferem na forma como o organismo responde ao probiótico. Alguns artigos de revisão têm mostrado que a compreensão das funções e composição do que seria um “microbioma saudável” possibilitaria o reconhecimento de cepas e espécies adaptáveis para finalidades específicas, sendo que as mesmas poderão ser utilizadas de forma personalizada, para auxiliar no tratamento de diferentes doenças (ZHANG; WANG; CHEN, 2019; RUAN et al., 2020).

É complexo definir o que seria um “microbioma saudável” e é compreensível que não exista um único padrão para essa comunidade, pois sua composição está diretamente ligada à alimentação, idade, fatores genéticos, ambientais e uso de medicamentos. Outros dados que ainda não são completamente conhecidos e são imprescindíveis para essa definição, se referem à composição e caracterização de todos os microrganismos presentes na microbiota intestinal, incluindo vírus, bacteriófagos, fungos e archaea, e as suas relações com o estado de saúde (SHANAHAN; GHOSH; O'TOOLE, 2021), devido a essas circunstâncias a realização de estudos envolvendo terapias personalizadas é tão relevante.

Considerando o exposto, nosso grupo de pesquisa vem executando estudos voltados à terapia personalizada com cepas potencialmente probióticas, buscando a modulação da microbiota intestinal e controle de doenças relacionadas à disbiose. O objetivo do tratamento personalizado é isolar cepas potencialmente probióticas da microbiota intestinal dos indivíduos saudáveis, e armazená-las em um banco de células, para posteriormente serem utilizadas na prevenção e/ou tratamento de doenças que o próprio doador eventualmente manifeste. Em um estudo realizado por Celiberto et al. (2018) foi constatado que a terapia personalizada com probióticos reduz os sintomas e alterações histológicas do cólon em modelo animal de colite induzida por *Dextran Sulfato de Sódio* (DSS), quando comparados aos probióticos comerciais. Esta abordagem ainda não foi testada em outros modelos de doenças associadas à disbiose, como a obesidade.

Em virtude dos fatos mencionados, a hipótese do estudo é que o tratamento personalizado apresentará maior efetividade na redução do risco e controle da obesidade, já que tem potencial para modular a microbiota intestinal, um fator envolvido na gênese da doença, sem inserir microrganismos exógenos ao paciente.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Obesidade

Desde 1975, a população mundial tem experimentado um aumento drástico nos índices de sobrepeso (índice de massa corpórea (IMC) - entre 25 e 29,9 Kg/m<sup>2</sup>) e obesidade (IMC  $\geq$ 30 Kg/m<sup>2</sup>), que afetam pessoas de todas as faixas etárias. Em 2016, cerca de 39% e 13% da população adulta mundial apresentava-se com sobrepeso ou obesidade, respectivamente. Esse cenário não é diferente entre a população na faixa etária entre 5 e 19 anos, onde a obesidade acometeu cerca de 7% da população (WHO, 2021).

Pessoas com obesidade tendem a apresentar problemas de saúde associados como hipertensão, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares (GIROTTI; ANDRADE; CABRERA, 2010; FERREIRA; SZWARCOWALD; DAMACENA, 2019), distúrbios musculoesqueléticos (especialmente osteoartrite), maior predisposição para doenças respiratórias (SILVEIRA; VIEIRA; SOUZA, 2018), e para alguns tipos de câncer (ovário, endométrio, mama, fígado, rins e cólon) (WHO, 2021).

Dietas não balanceadas, contendo alimentos industrializados com alto teor calórico e ricas em carboidratos refinados e lipídios saturados, associadas ao sedentarismo, são os principais fatores envolvidos no aumento da prevalência da obesidade no mundo (STEIN; COLDITZ, 2004; SOUZA et al., 2018; MUSSI; PETRÓSKI, 2019). Além dos fatores ambientais e estilo de vida, fatores genéticos e a composição da microbiota

intestinal também têm sido relacionados à gênese da obesidade (AL-ASSAL et al., 2018).

A participação da microbiota intestinal na gênese da obesidade envolve alguns mecanismos que atuam em conjunto: a) extração e absorção de energia, pela fermentação de carboidratos não digeríveis; b) manutenção ou modificação na permeabilidade intestinal, influenciando a translocação microbiana e consequentemente o processo inflamatório característico da obesidade (CANI et al., 2009); c) regulação e secreção de metabólitos intestinais, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que estimulam a liberação intestinal dos hormônios indutores de saciedade, peptídeo YY e peptídeo-1 semelhante ao glucagon (*glucagon-like peptide-1 (GLP-1)*). Os AGCC também atuam nos adipócitos, onde aumentam a lipólise e a liberação de leptina (SAMUEL et al., 2008; WALL et al., 2009; MUSSO; GAMBINO; CASSADER, 2010).

Os AGCC butirato, propionato, acetato e lactato são originados no cólon a partir da fermentação de carboidratos não digeríveis; como fibras dietéticas, prebióticos e probióticos (PRYDE et al., 2002; ROY et al., 2006; CANANI et al., 2011). Alguns gêneros de bactérias presentes no cólon humano são capazes de produzir butirato, incluindo *Anaerostipes*, *Butyrivibrio*, *Coprococcus*, *Eubacterium*, *Roseburia*, *Ruminococcus* e *Clostridium* (CHEN et al., 2020; FU et al., 2019). O butirato desempenha diversos efeitos benéficos na prevenção da obesidade, sendo alguns de seus mecanismos: indução da saciedade, atuando na redução do ganho de massa gorda, esteatose hepática, além de contribuir com a melhora da

hiperglicemia e resistência à insulina. Entretanto, os mecanismos subjacentes a esse fenômeno, precisam ser estudados mais a fundo, como a sua ação na oxidação de ácidos graxos (LI et al., 2018) e redução da inflamação sistêmica que pode estar ligada a mudanças benéficas na microbiota intestinal e melhora na função de barreira intestinal (FANG et al., 2019).

O desequilíbrio na composição da microbiota intestinal, conhecido como disbiose, é caracterizado pela mudança na concentração e diversidade dos microrganismos, com aumento na população dos patogênicos, em detrimento aos benéficos (MORAES et al., 2014). Além disso, a microbiota intestinal disbiótica tende a apresentar alterações funcionais, que podem afetar o metabolismo e funcionamento do sistema imune do indivíduo (TIFFANY; BÄUMLER, 2019).

Evidências científicas sinalizam que as alterações na abundância e funcionalidade da microbiota intestinal podem indicar uma propensão à obesidade (KOLEVA; BRIDGMAN; KOZYRSKYJ, 2015). O estado disbiótico contribui para o aumento da permeabilidade intestinal e exposição a antígenos, especialmente aos lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram negativas, levando a estimulação do sistema imunológico, instalação e perpetuação de um processo inflamatório conhecido como endotoxemia metabólica, associado à obesidade (BARBUTI et al, 2020; THURSBY; JUGE, 2017).

Estudos mostram que a microbiota intestinal de indivíduos com obesidade apresenta uma alteração na sua composição, exibindo maior

proporção de microrganismos pertencentes ao filo *Firmicutes* e menor de *Bacteroidetes* e que a razão entre esses dois filos (*Firmicutes*: *Bacteroidetes*) tende a diminuir com a redução no peso corpóreo. Este desequilíbrio na composição da microbiota intestinal promoveria um aumento na capacidade de absorção de energia a partir da dieta e alteração na resposta imune do indivíduo, favorecendo um estado de obesidade (CARICILLI et al., 2011; KRAJMALNIK-BROWN et al., 2012; SWEENEY; MORTON, 2013; KOLIADA et al., 2017; QADIR; ASSAFI, 2021). Outros estudos evidenciam que modificações em níveis taxonômicos mais baixos (gêneros e espécies) poderiam explicar melhor a disbiose observada na obesidade, onde o aumento de *Lactobacillus* spp. (ARMOUGOM et al., 2009; MILLION et al., 2012) e redução de *Bifidobacterium* spp. foi associado ao ganho de peso e obesidade (MILLION et al., 2012). Uma revisão sistemática constatou que pessoas portadoras de obesidade apresentam maior concentração de *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Mollicutes*, *Limosilactobacillus reuteri* e menor de *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia* (*Akkermansia muciniphila*), *Faecalibacterium prausnitzii*, *Methanobrevibacter smithii*, *Lactiplantibacillus plantarum* e *Lacticaseibacillus paracasei* (CROVESY; MASTERSON; ROSADO, 2020).

Nesse sentido, a microbiota intestinal tem se tornado um alvo das possíveis estratégias para prevenir ou tratar a obesidade.

## 2.2 Estratégias para modulação da microbiota intestinal

A microbiota humana é formada por trilhões de microrganismos que vivem em simbiose. Na tentativa de criar padrões de composição para essa população de microrganismos, em 2011 foi proposta a classificação da microbiota intestinal baseada na abundância de *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp. e *Ruminococcus* spp., correspondendo aos enterótipos 1, 2 e 3, respectivamente (ARUMUGAM et al., 2011). Os diferentes enterótipos parecem se relacionar com a capacidade de digestão de nutrientes e preferência em relação a substratos (COSTEA et al., 2018). Em 2016, o conceito de enterótipos foi revisado a partir da compilação dos dados de Arumugam et al. (2011) e de outros cinco estudos, com o intuito de melhorar a caracterização dos microrganismos presentes no intestino. Este estudo constatou a ausência de táxons bacterianos consistentes associados a comunidades dominadas de *Bacteroides* ou *Prevotella* e propôs o uso do termo “biomarcador” ao invés de “enterótipo”. Além disso, o termo “biomarcador” parece descrever melhor os táxons correlacionados com a dieta, estilo de vida e doença (GORVITOVSKAIA; HOLMES; HUSE, 2016).

Apesar de não sabermos ao certo se as modificações na microbiota intestinal são a causa ou a consequência da obesidade, a sua participação no desenvolvimento da doença é inquestionável. Nesse sentido, a microbiota intestinal tem se tornado um alvo das possíveis estratégias para auxiliar na redução de risco ou no tratamento da obesidade.

Com o intuito de modular os microrganismos presentes na microbiota intestinal e auxiliar no tratamento de doenças relacionadas à disbiose, diferentes estratégias estão sendo utilizadas, destacando-se o uso de ATB,

o TMF e o uso de probióticos; que podem melhorar ou manter a saúde do paciente (ROHLKE; SURAWICZ; STOLLMAN, 2010; MORAES et al., 2014; PAMER, 2014; BOULANGÉ et al., 2016; CAMMAROTA et al., 2017; RAMIREZ, 2017; FODOR et al., 2019).

Alguns ATB, como a rifaximina, têm sido utilizados para tratar doenças intestinais e modular a microbiota intestinal. O tratamento com esse antimicrobiano resulta em aumento na população de *Lactobacillus* spp. (XU et al. 2014) e *Faecalibacterium prausnitzii* (SOLDI et al., 2015) ou alterações modestas e transitórias sobre a comunidade microbiana fecal (FODOR et al., 2019). Entre os efeitos indesejáveis associados a essa terapia estão a possibilidade de seleção de patógenos resistentes e a disbiose a longo prazo (CARMAN et al., 2012; KOTHARY et al., 2013; RIZZATTI; IANIRO; GASBARRINI, 2018).

Desta forma, alguns aspectos precisam ser levados em consideração, como os efeitos no sistema imunológico, resistência e número de exposições ao fármaco (WILLING; RUSSELL; FINLAY, 2011). Os efeitos negativos causados pelos ATB são amenizados diante da redução do uso e da duração do tratamento. As vias de administração (via oral, via gavagem e intravenosa) também influenciam na alteração da microbiota intestinal em decorrência dos parâmetros farmacocinéticos (TAN et al., 2020).

Outra estratégia utilizada na modulação da microbiota intestinal é o TMF, que além de modular a microbiota auxilia no tratamento de doenças intestinais (principalmente colite e infecções recorrentes por *Clostridium difficile*) e extra intestinais (doenças neurológicas e do

neurodesenvolvimento). Entretanto, essa técnica é controversa em função de seus efeitos adversos e possibilidade de alteração metabólica e transmissão de infecções ocultas (XU et al., 2015), que são advindas da preparação manual do TMF (liquidificação das fezes em solução salina); em contrapartida a preparação da microbiota lavada em equipamento específico, minimiza os eventos adversos do TMF realizado em paciente com colite ulcerativa e doença de Crohn. Esse processamento automatizado, é composto pelo sistema de microfiltração que tem a capacidade de filtrar os resíduos de alimentos não digeridos, ovos de parasitas, fungos e outros fragmentos pequenos; e pelo processo de purificação que lava partículas de bactérias, metabólitos, moléculas solúveis e proteínas (ZHANG et al., 2020).

Mediante a possibilidade de realizar o TMF, é importante obter informações sobre a função da microbiota intestinal em cada doença crônica. Essa estratégia requer algumas características clínicas do doador, como voluntários saudáveis e que apresentem estilo de vida equilibrado, ausência de doenças crônicas, metabólicas ou câncer e exames laboratoriais que comprovem o estado de saúde. As respostas clínicas ao tratamento dependem da compreensão dos fatores ambientais, relacionados à dieta e aos aspectos individuais do doador que irão determinar o sucesso ou não no TMF. Desta forma, o “potencial terapêutico” do tratamento está ligado às possíveis modificações no estilo de vida ou nas medidas farmacológicas (BIBBÒ et al., 2020).

Segundo FAO/OMS (2002) e Hill et al. (2014) os probióticos são definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro”. Evidências mostram que a modulação da microbiota intestinal pelo uso de probióticos se deve ao aumento da população de bactérias benéficas, melhora na função de barreira do epitélio intestinal e à produção de compostos antimicrobianos (AZAD et al., 2018).

Estudos conduzidos em camundongos obesos que fizeram uso de algumas cepas probióticas têm mostrado resultados promissores. A ingestão de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765 resultou em redução da quantidade de células adiposas, dos níveis séricos de colesterol, glicose e triglicerídeos, além de amenizar disfunções imunológicas (CANO et al., 2013). Em outra pesquisa, a suplementação com *Latilactobacillus curvatus* HY7601 (antes *Lactobacillus curvatus* HY7601) e *Lactiplantibacillus plantarum* KY1032 (antes *Lactobacillus plantarum* KY1032) resultou em redução no ganho ponderal e na adiposidade (PARK et al., 2013).

Marchesin et al. (2018) avaliaram o efeito de um produto à base de extrato aquoso de soja, fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* 416 e com adição de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, sobre a composição da microbiota fecal e variação de peso corporal de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica. Quando comparado ao grupo obeso sem tratamento, o grupo que recebeu o produto probiótico apresentou peso médio inferior até a nona semana do estudo ( $p < 0,05$ ) e menor diâmetro de adipócitos. Além disso, a ingestão do probiótico

contribuiu com o equilíbrio da microbiota intestinal, mantendo a proporção de microrganismos do filo *Bacteroidetes* e promovendo um aumento na população de *Bifidobacterium* spp.

Apesar dos efeitos positivos observados, a capacidade da microbiota intestinal manter a sua composição e a individualidade genética são consideradas fatores limitantes para o êxito das terapias com probióticos e podem explicar parcialmente os resultados, muitas vezes contraditórios, obtidos com essa abordagem (CELIBERTO et al., 2018).

As terapias personalizadas são consideradas uma importante opção para maximizar os efeitos de medicamentos, modular a microbiota intestinal e tratar certas doenças (ZMORA et al., 2016). Os trabalhos que avaliaram os efeitos da terapia personalizada com probióticos são poucos e objetivaram a seleção de cepas produtoras de metabólitos específicos ou melhora no desempenho de determinado grupo de indivíduos (HO et al., 2014; SCHEIMAN, 2018).

Considerando a importância atual dos tratamentos personalizados, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo dessa terapia, utilizando cepas potencialmente probióticas, para a restauração da microbiota intestinal e melhora nos sintomas de doenças associadas à alteração nessas comunidades de microrganismos. O tratamento personalizado proposto por nosso grupo de pesquisa se diferencia das demais propostas, pois, baseia-se no isolamento de cepas de bactérias potencialmente probióticas das fezes do indivíduo saudável e o seu armazenamento em um banco de células, para serem utilizadas no

tratamento de doenças relacionadas à disbiose, que venham a se manifestar no indivíduo doador das cepas. O primeiro estudo realizado por nosso grupo testou a terapia personalizada em modelo de colite induzida por (DSS) e os resultados foram superiores ao obtido com cepa comercial (CELIBERTO et al., 2018). Tais resultados sinalizaram que outras doenças, em que a composição da microbiota intestinal assuma uma importância fundamental, como a obesidade, também poderiam ser beneficiadas por essa abordagem.

### **3 OBJETIVOS**

#### *3.1 Objetivo Geral*

O objetivo desse estudo consiste em avaliar o efeito da terapia personalizada com consórcio de bactérias fecais na redução do risco da obesidade e suas consequências em animais.

#### *3.2 Objetivos Específicos*

- Avaliar o ganho de peso dos animais durante o experimento;
- Avaliar a eficácia alimentar;
- Determinar o efeito das alterações no perfil lipídico e glicemia em jejum;
- Realizar a análise histológica do tecido adiposo;
- Determinar as concentrações de citocinas pró e anti-inflamatórias;
- Avaliar a composição da microbiota fecal por métodos moleculares.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

Cepas de bactérias comensais (*Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus galinarrium*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Leuconostoc lactis*, *Weisiella confusa* e *Streptococcus salivarius*), potencialmente probióticas, isoladas das fezes de cinco crianças, entre dois e cinco anos de idade.

### 4.2 Coleta de amostras fecais das crianças para o TMF e isolamento das cepas potencialmente probióticas

A coleta de amostras fecais das cinco crianças para o TMF e para o isolamento das cepas foi previamente realizado por Silva (2020), como parte do trabalho de dissertação de mestrado. O protocolo de coleta para o TMF e para o isolamento das cepas foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), Araraquara sob o nº 50423421.0.0000.5426 (ANEXO 1) e nº 14569519.4.0000.5426 (ANEXO 2).

### 4.3 Animais

Camundongos machos da linhagem Swiss (Unib: SW), de seis semanas de idade, *Specific Pathogen Free* (SPF), adquiridos do Centro de Pesquisa e Produção de Animais (CPPA) do Instituto de Biotecnologia

(IBTEC), UNESP, Botucatu; foram mantidos durante todo o experimento no Biotério do Departamento de Ciências Biológicas da UNESP, FCF, Araraquara. Os animais foram mantidos e manipulados em conformidade com as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNESP, FCF, Araraquara. O protocolo experimental teve início após aprovação da CEUA, sob o protocolo nº 27/2020 (ANEXO 3).

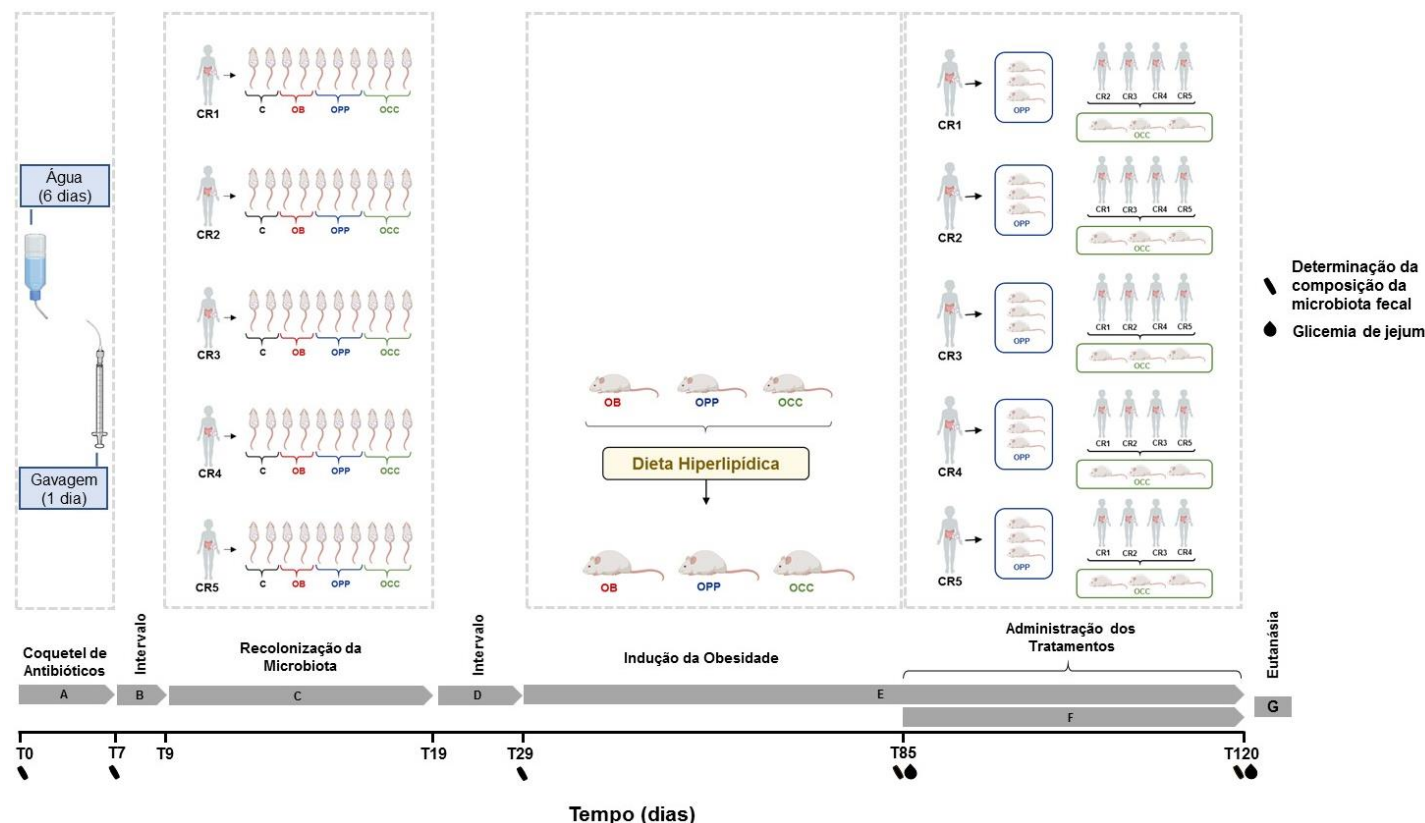
Todos os animais foram alojados em caixas de polipropileno mantidas em estante ventilada (Alesco E-520, Brasil), com temperatura controlada de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2$  e com fotoperíodo claro/escuro de 12 horas. Os animais passaram por um período de adaptação de sete dias, em que tiveram livre acesso à ração comercial padrão (Neovia Nutrição e Saúde Animal Ltda) e água autoclavada. Ao término da adaptação, os animais ( $n=48$ ) foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos:

- Controle (C): sem indução da obesidade ( $n=10$ );
- Obeso (OB): obesidade induzida por dieta hiperlipídica (DHL) e sem tratamento ( $n=10$ );
- Obeso + Probiótico Personalizado (OPP): obesidade induzida por DHL e posteriormente tratado com as cepas isoladas da microbiota fecal de criança (tratamento personalizado) ( $n=15$ );
- Obeso + Cepas Compartilhadas (OCC): obesidade induzida por DHL e que receberam uma mistura de cepas isoladas da microbiota fecal das crianças (três cepas de cada criança - tratamento não personalizado) ( $n=13$ ).

#### *4.4 Protocolo experimental*

O experimento teve duração de 120 dias e as diferentes etapas do protocolo são descritas a seguir (Figura 1).

**Figura 1.** Esquema do protocolo experimental para o estudo da obesidade.



(A) Os camundongos (n=50) receberam um coquetel de antibióticos para a depleção da microbiota intestinal, (B) período de recuperação (dois dias). (C) Recolonação da microbiota intestinal via TMF: cada uma das cinco crianças doadoras colonizou dez animais (cinco administrações por gavagem oral). (D) Os animais receberam dieta convencional para estabilização da nova microbiota intestinal (10 dias). (E) Os camundongos dos grupos OB, OPP e OCC foram induzidos a obesidade (91 dias). (F) Administração dos tratamentos (grupos OPP e grupos OCC). (G) Após cinco semanas de tratamento, os animais foram eutanasiados. C: controle sem indução da obesidade; OB: obesidade induzida por DHL e sem tratamento; OPP: obesidade induzida por DHL e que receberam o tratamento personalizado; OCC: obesidade induzida por DHL e que receberam as cepas compartilhadas (tratamento não personalizado). CR1 - CR5: crianças doadoras das amostras de fezes para o TMF e tratamentos administrados. **Fonte:** próprio autor, criado com BioRender.com.

#### *4.4.1 Depleção da microbiota intestinal pela administração de ATB*

Após uma semana de adaptação no biotério, todos os animais receberam, durante sete dias, um coquetel contendo quatro ATB não absorvíveis, adicionados por seis dias na água potável autoclavada oferecida aos animais (1º, 2º, 3º, 5º, 6º e 7º dia) e um dia administrados por gavagem oral, uma vez ao dia, pela manhã (4º dia). A água suplementada com o coquetel de ATB foi renovada todos os dias. As concentrações utilizadas para os ATB adicionados na água foram: 1 mg/mL ampicilina (Laboratório Teuto Brasileiro S/A, Brasil), 1 mg/mL neomicina (Infinity Pharma, Brasil), 1 mg/mL metronidazol (Valdequímica, China) e 0,5 mg/mL vancomicina (ABL – Antibióticos do Brasil, Brasil). Para gavagem oral, os camundongos receberam um volume de 10 µL/g de peso corporal de água potável autoclavada suplementada com 10 mg/mL ampicilina, 10 mg/mL neomicina, 10 mg/mL metronidazol e 5 mg/mL vancomicina. Ao término do sétimo dia, os camundongos passaram por uma recuperação de dois dias (TIRELLE et al., 2020).

#### *4.4.2 Recolonização da microbiota intestinal pela administração do TMF*

Essa etapa foi realizada com o objetivo de simular a microbiota humana. O TMF foi administrado cinco vezes por gavagem oral, com intervalo de dois dias entre cada administração. Os animais receberam um volume de 150 µL (STALEY et al., 2017) da suspensão de amostras fecais, onde cada uma das cinco crianças doadoras colonizou dez animais (Figura 1). Após receber a quinta gavagem de TMF, os animais foram mantidos por

dez dias sob dieta convencional, para colonização da nova microbiota intestinal.

*Preparação do TMF:* Sucintamente, 50 g de fezes frescas foram homogeneizadas por liquidificação em 250 mL de *phosphate-buffered saline* (PBS) estéril, e posteriormente, o conteúdo sólido foi separado com o auxílio de um tamis de 0,25 mm, seguido de centrifugação (3381 x g/ 15min). O sobrenadante foi descartado, e a amostra foi ressuspensa em 125 mL de PBS, com adição de 10% de glicerol (12,5 mL), e armazenada à -80 °C. Antes da administração, as amostras de TMF foram descongeladas por um período de uma a duas horas, em recipiente com gelo (HAMILTON et al., 2012; STALEY et al., 2017).

#### 4.4.3 Indução da obesidade

A indução da obesidade foi feita pela ingestão de ração com alto teor de lipídios (5,24 g/Kcal; carboidrato: 27,18% do Valor Energético Total - VET; proteína: 14,51% do VET e lipídeo: 58,31% do VET), durante 91 dias. A DHL foi adquirida da PRAGSOLUÇÕES Biociências® (Jaú, Brasil) e a sua composição foi adaptada de White et al. (2013) e Marchesin et al. (2018) (Tabela 1). Os animais pertencentes aos grupos OB, OPP e OCC, receberam DHL *ad libitum* durante toda essa etapa do protocolo experimental. A ingestão de ração foi monitorada a cada dois dias e o peso foi aferido semanalmente.

**Tabela 1.** Composição nutricional da dieta hiperlipídica oferecida aos animais em estudo, para indução da obesidade.

| Ingredientes             | DHL            |        |          |
|--------------------------|----------------|--------|----------|
|                          | Quantidade (%) | Kcal/g | Kcal (%) |
| Amido de milho           | 4,84           | 0,19   | 3,69     |
| Farelo de soja           | 41,00          | 1,44   | 27,54    |
| Amido dextrinizado       | 5,00           | 0,20   | 3,81     |
| Sacarose                 | 8,00           | 0,32   | 6,10     |
| Banha                    | 30,00          | 2,70   | 51,46    |
| Óleo de soja             | 3,79           | 0,34   | 6,50     |
| Celulose microcristalina | 2,54           | -      | -        |
| L-cistina                | 0,18           | 0,01   | 0,14     |
| Bitartarato de colina    | 0,15           | -      | -        |
| Butil-hidroxitolueno     | 0,01           | -      | -        |
| Mix mineral AIN 93       | 3,50           | -      | -        |
| Mix vitaminas AIN 93     | 1,00           | 0,04   | 0,76     |
| Total                    | 100,00         | 5,24   | 40,00    |

Dieta hiperlipídica (DHL): carboidratos: 27,18% do VET, proteínas: 14,51% do VET e lipídios: 58,31% do VET. Kcal/g: quilocaloria/grama. Fonte: adaptado de White et al. (2013) e Marchesin et al. (2018).

#### 4.4.4 Tratamentos Personalizado e Cepas Compartilhadas

As cepas potencialmente probióticas, previamente isoladas de voluntários saudáveis (crianças), foram posteriormente cultivadas em meios específicos (água de Man, Rogosa & Sharpe, água *Brain Heart Infusion* e água BIM-25 - Reinforced *Clostridium* Agar) e administradas aos grupos OPP (Tabela 2) e OCC (Tabela 3).

Para o tratamento personalizado (Grupo OPP) foram montados *pools* de cepas selecionadas de cada uma das cinco crianças doadoras de fezes (um *pool* por criança) e para o tratamento com cepas compartilhadas foram

utilizadas três cepas de cada criança, com o cuidado de não incluir cepas da criança cuja microbiota fecal foi utilizada para colonizar o animal que recebeu o tratamento. Cada cepa estava presente na concentração de  $3.10^8$  UFC, em um volume final de 300  $\mu$ L (volume que foi administrado aos animais). As cepas foram acondicionadas em *eppendorf*, adicionadas de 10% de glicerol e armazenadas à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . No dia da administração, as cepas foram descongeladas em banho à  $35 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  e centrifugadas ( $3381 \times g/15\text{min}$ ). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 300  $\mu$ L de PBS (VAN DER LELIE et al., 2021; LENGFELDER et al., 2019). A administração dos tratamentos teve duração de 35 dias, foi iniciada no T85 e feita por gavagem, no período da manhã. Os animais dos grupos C e OB receberam diariamente, a mesma quantidade de PBS (300  $\mu$ L), para simular o estresse da gavagem.

**Tabela 2.** Pools de cepas utilizadas no tratamento oferecido aos animais dos grupos OPP (tratamento personalizado).

| N.   | Criança 1            | N.   | Criança 2           | N.    | Criança 3           | N.   | Criança 4            | N.    | Criança 5         |
|------|----------------------|------|---------------------|-------|---------------------|------|----------------------|-------|-------------------|
| 1.1  | <i>L. paracasei</i>  | 2.4  | <i>E. faecalis</i>  | 3.9   | <i>L. paracasei</i> | 4.21 | <i>E. faecium</i>    | 5.27  | <i>L. lactis</i>  |
| 1.2  | <i>L. paracasei</i>  | 2.8  | <i>E. faecium</i>   | 3.10  | <i>L. paracasei</i> | 4.27 | <i>S. salivarius</i> | 5.29  | <i>L. lactis</i>  |
| 1.6  | <i>L. paracasei</i>  | 2.12 | <i>E. faecalis</i>  | 3.19  | <i>L. paracasei</i> | 4.29 | <i>E. faecalis</i>   | 5.32  | <i>L. lactis</i>  |
| 1.9  | <i>L. rhamnosus</i>  | 2.13 | <i>E. faecalis</i>  | 3.21  | <i>L. paracasei</i> | 4.46 | <i>E. hirae</i>      | 5.33  | <i>L. lactis</i>  |
| 1.10 | <i>L. rhamnosus</i>  | 2.14 | <i>E. faecium</i>   | 3.55  | <i>L. paracasei</i> | 4.52 | <i>E. hirae</i>      | 5.59  | <i>L. lactis</i>  |
| 1.16 | <i>L. paracasei</i>  | 2.18 | <i>E. faecium</i>   | 3.61  | <i>L. paracasei</i> | 4.59 | <i>E. faecium</i>    | 5.76  | <i>L. lactis</i>  |
| 1.23 | <i>E. faecalis</i>   | 2.23 | <i>L. paracasei</i> | 3.107 | <i>E. faecium</i>   | 4.60 | <i>E. faecium</i>    | 5.85  | <i>L. lactis</i>  |
| 1.27 | <i>E. faecalis</i>   | 2.24 | <i>E. hirae</i>     | 3.124 | <i>E. faecium</i>   | 4.72 | <i>E. faecium</i>    | 5.105 | <i>W. confusa</i> |
| 1.29 | <i>E. faecalis</i>   | 2.25 | <i>L. paracasei</i> | 3.126 | <i>E. faecalis</i>  | 4.89 | <i>L. lactis</i>     | 5.106 | <i>W. confusa</i> |
| 1.30 | <i>L. paracasei</i>  | 2.26 | <i>E. faecium</i>   |       |                     |      |                      | 5.109 | <i>W. confusa</i> |
| 1.36 | <i>L. paracasei</i>  | 2.28 | <i>L. paracasei</i> |       |                     |      |                      | 5.112 | <i>W. confusa</i> |
| 1.41 | <i>S. salivarius</i> | 2.32 | <i>L. paracasei</i> |       |                     |      |                      | 5.119 | <i>W. confusa</i> |
| 1.71 | <i>E. faecium</i>    | 2.37 | <i>L. paracasei</i> |       |                     |      |                      |       |                   |
| 1.72 | <i>E. hirae</i>      | 2.39 | <i>E. faecium</i>   |       |                     |      |                      |       |                   |

N.: número de identificação da cepa. *E. faecium*: *Enterococcus faecium*; *E. faecalis*: *Enterococcus faecalis*, *E. avium*: *Enterococcus avium*, *E. hirae*: *Enterococcus hirae*; *L. paracasei*: *Lacticaseibacillus paracasei*, *L. rhamnosus*: *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *L. lactis*: *Leuconostoc lactis*, *W. confusa*: *Weissella confusa* e *S. salivarius*: *Streptococcus salivarius*.

**Tabela 3.** Pools de cepas utilizadas no tratamento oferecido aos animais dos grupos OCC (tratamento não personalizado).

| N.    | Criança 1           | N.    | Criança 2           | N.    | Criança 3           | N.    | Criança 4           | N.    | Criança 5           |
|-------|---------------------|-------|---------------------|-------|---------------------|-------|---------------------|-------|---------------------|
| 2.23  | <i>L. paracasei</i> | 1.9   | <i>L. rhamnosus</i> | 1.9   | <i>L. rhamnosus</i> | 1.9   | <i>L. rhamnosus</i> | 1.9   | <i>L. rhamnosus</i> |
| 2.24  | <i>E. hirae</i>     | 1.16  | <i>L. paracasei</i> | 1.16  | <i>L. paracasei</i> | 1.16  | <i>L. paracasei</i> | 1.16  | <i>L. paracasei</i> |
| 2.39  | <i>E. faecium</i>   | 1.71  | <i>E. faecium</i>   | 1.71  | <i>E. faecium</i>   | 1.71  | <i>E. faecium</i>   | 1.71  | <i>E. faecium</i>   |
| 3.9   | <i>L. paracasei</i> | 3.9   | <i>L. paracasei</i> | 2.23  | <i>L. paracasei</i> | 2.23  | <i>L. paracasei</i> | 2.23  | <i>L. paracasei</i> |
| 3.10  | <i>L. paracasei</i> | 3.10  | <i>L. paracasei</i> | 2.24  | <i>E. hirae</i>     | 2.24  | <i>E. hirae</i>     | 2.24  | <i>E. hirae</i>     |
| 3.124 | <i>E. faecium</i>   | 3.124 | <i>E. faecium</i>   | 2.39  | <i>E. faecium</i>   | 2.39  | <i>E. faecium</i>   | 2.39  | <i>E. faecium</i>   |
| 4.29  | <i>E. faecalis</i>  | 4.29  | <i>E. faecalis</i>  | 4.29  | <i>E. faecalis</i>  | 3.9   | <i>L. paracasei</i> | 3.9   | <i>L. paracasei</i> |
| 4.59  | <i>E. faecium</i>   | 4.59  | <i>E. faecium</i>   | 4.59  | <i>E. faecium</i>   | 3.10  | <i>L. paracasei</i> | 3.10  | <i>L. paracasei</i> |
| 4.89  | <i>L. lactis</i>    | 4.89  | <i>L. lactis</i>    | 4.89  | <i>L. lactis</i>    | 3.124 | <i>E. faecium</i>   | 3.124 | <i>E. faecium</i>   |
| 5.27  | <i>L. lactis</i>    | 5.27  | <i>L. lactis</i>    | 5.27  | <i>L. lactis</i>    | 5.27  | <i>L. lactis</i>    | 4.29  | <i>E. faecalis</i>  |
| 5.59  | <i>L. lactis</i>    | 5.59  | <i>L. lactis</i>    | 5.59  | <i>L. lactis</i>    | 5.59  | <i>L. lactis</i>    | 4.59  | <i>E. faecium</i>   |
| 5.105 | <i>W. confusa</i>   | 5.105 | <i>W. confusa</i>   | 5.105 | <i>W. confusa</i>   | 5.105 | <i>W. confusa</i>   | 4.89  | <i>L. lactis</i>    |

N.: número de identificação da cepa. *E. faecium*: *Enterococcus faecium*; *E. faecalis*: *Enterococcus faecalis*, *E. avium*: *Enterococcus avium*, *E. hirae*: *Enterococcus hirae*; *L. paracasei*: *Lacticaseibacillus paracasei*, *L. rhamnosus*: *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *L. lactis*: *Leuconostoc lactis*, *W. confusa*: *Weissella confusa* e *S. salivarius*: *Streptococcus salivarius*.

## 5 COLETA DE AMOSTRAS E EUTANÁSIA

Foram coletadas amostras de fezes frescas (180–220 mg) em diferentes tempos do protocolo experimental (T0, T7, T29, T85, T120), para a análise de composição da microbiota fecal. Para a coleta das amostras, os animais foram colocados em caixas individuais higienizadas e sem maravalha, até a obtenção da quantidade suficiente de fezes.

As amostras de sangue para determinação de glicemia em jejum foram coletadas antes da introdução dos tratamentos e no final do protocolo (T85 e T120), por punção da veia caudal.

No final do protocolo experimental (T120), após período de jejum de seis horas, os animais foram eutanasiados por exsanguinação sob anestesia de xilazina (16 mg/kg) e cetamina (90 mg/kg), administradas pela via intraperitoneal. As amostras de sangue coletadas por punção cardíaca, em tubos heparinizados, foram utilizadas para a determinação de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG) e HDL colesterol (HDLc). Em seguida, as deposições de gordura epididimal e retroperitoneal (tecido adiposo intra-abdominal), foram removidas, pesadas em balança semi-analítica (SHIMADZU, BL 3200H) e aliquotadas para as análises histológicas (gordura epididimal) e imunológicas (gordura retroperitoneal).

As fezes e o plasma foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados à -80 °C. As amostras de gordura epididimal foram fixadas em formaldeído a 10%/ 24h, lavadas em água corrente por 24h e armazenadas em álcool 70° GL, até o momento das análises. Alíquotas de 30 mg (sendo,

15 mg do lado direito + 15 mg do lado esquerdo) de deposições de gordura retroperitoneal foram pesadas em balança semi-analítica (SHIMADZU, BL 3200H), acondicionadas em tubos *ependorf* (2 mL) contendo 300 µL de inibidor de protease, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas à -80 °C.

## 5.1 Métodos

### 5.1.1 Variação ponderal

O percentual do ganho e/ou perda de peso foi calculado pela diferença entre o peso final (PF) e o peso inicial (PI), pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ ganho ou perda de peso} = \frac{PF \times 100}{PI}$$

Onde:

PF: peso corporal final (g) do animal

PI: peso corporal inicial (g) do animal

### 5.1.2 Determinação do coeficiente de eficácia alimentar (CEA)

O CEA, calculado pela razão entre o ganho de peso (g) e a quantidade de ração consumida (g), foi utilizado para determinar a Eficiência Alimentar (EA) das dietas, durante período de indução da obesidade (MANG et al., 2015).

$$CEA = \frac{(PF - PI)}{TA}$$

Onde:

PF: peso corporal final (g) do animal (término do experimento)

PI: peso corporal inicial (g) do animal

TA: quantidade total de alimento (ração) ingerido no período experimental (g)

### 5.1.3 Glicemia de jejum

O teste de glicemia de jejum foi realizado nos tempos T85 e T120, por leitura direta em glicosímetro portátil (*G-tech Free Sistema NoCode, Republic of Korea*), utilizando 0,9 µL de sangue da veia caudal dos camundongos.

### 5.1.4 Determinação de CT e frações

O sangue coletado por punção cardíaca foi centrifugado (1800 x g/ 15min) e o plasma obtido foi utilizado para determinação de CT, TG e HDLc. Para a quantificação dos parâmetros foram utilizados kits comerciais (Labtest Diagnostica SA, Brasil).

Os valores de não HDLc, foram calculados usando a seguinte fórmula (VIRANI, 2011):

$$\text{não HDLc} = \text{CT} - \text{HDLc}$$

Onde:

não HDLc: não-HDL colesterol

CT: colesterol total

HDLc: HDL colesterol

### 5.1.5 Análise histológica da gordura intra-abdominal

As amostras de gordura intra-abdominal foram incluídas em parafina e cortes de 5 µm de espessura foram montados em lâminas de vidro e

corados com hematoxilina e eosina (H&E) (CARDING et al., 2015; BOULANGÉ et al., 2016).

As células adiposas foram avaliadas em um microscópio óptico (Olympus BX51 - Olympus Optical, Tokyo Japan) acoplado a uma câmera CCD-Iris (Tokyo Japan - Olympus) e sistema analisador de imagens (software ImageJ). A área e o diâmetro das células adiposas (200 células por grupo experimental) foram aferidos para determinar o efeito do tratamento na composição das mesmas (PARLEE et al., 2014).

#### 5.1.6 Determinação de citocinas

Resumidamente, as amostras de gordura retroperitoneal foram descongeladas e homogeneizadas em homogeneizador ULTRA-TURRAX (IKA® T10 *basic*). A solução obtida foi centrifugada (2348 x g, 10min a 4 °C) e o sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de citocinas, interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (BioLegend®, EUA), interleucina-10 (IL-10) (BD Biosciences, EUA), fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (R&D SYSTEMS a biotechne® brand, EUA) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (BioLegend®, EUA), por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (LANE; WU-HSIEH; HOWARD, 1993).

#### 5.1.7 Determinação da composição da microbiota fecal

A extração do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) foi feita com a utilização do kit comercial *QIAamp Fast DNA Stool* (Qiagen, EUA) e o sequenciamento do material genético foi realizado no equipamento *Illumina*

*MiSeq® System* (Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica para sequenciamento de DNA, UNESP, FCAV, Jaboticabal) com *MiSeq Reagent Kit v3*, de acordo com as instruções do fabricante. A região hipervariável V3-V4 do gene RNA ribossomal (rRNA 16S) bacteriano foi amplificada usando 2 × *KAPA HiFi HotStart ReadyMix DNA polimerase* (Kapa Biosystems Ltd.) e os seguintes *primers* V3-V4 *Forward* (F): 5' - CCTACGGGNGGCWGCAG 3'; V3-V4 *Reverse* (R): 5' - GACTACHVGGGTATCTAATCC 3' (HERLEMANN et al., 2011; KLINDWORTH et al, 2013).

Os dados do sequenciamento das amostras foram previamente analisados e agrupados segundo a taxonomia, usando o aplicativo *16S Metagenomics* disponível na plataforma *BaseSpace Sequence Hub* da Illumina (<https://basespace.illumina.com/>). O conjunto de dados do sequenciamento (*reads*) foi classificado utilizando a base de dados *Greengenes* (MCDONALD et al., 2012), alcançando sensibilidade em nível de espécie. A abundância relativa (%) de táxons foi estimada por comparação com o número total de sequências obtidas para a amostra.

## 6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Todos os dados coletados foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de *Shapiro-Wilk*, e quanto ao pressuposto à homocedasticidade. A variação de peso e glicemia de jejum foram submetidas à análise de variância (ANOVA mista) e teste de médias de *Sidak* ( $p < 0,05$ ). A ingesta de

ração, determinação de CT e frações, peso e área do tecido adiposo epididimal e a concentração de citocinas, foram submetidos à ANOVA e teste de médias de *Tukey* ( $p < 0,05$ ). O CEA, peso do tecido adiposo retroperitoneal e diâmetro do tecido adiposo epididimal foram submetidos à ANOVA e teste de médias de *Games-Howell* ( $p < 0,05$ ). Todos os dados foram avaliados no programa estatístico SPSS (*Statistical Package for the Social Science*).

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 Depleção e recolonização da microbiota intestinal

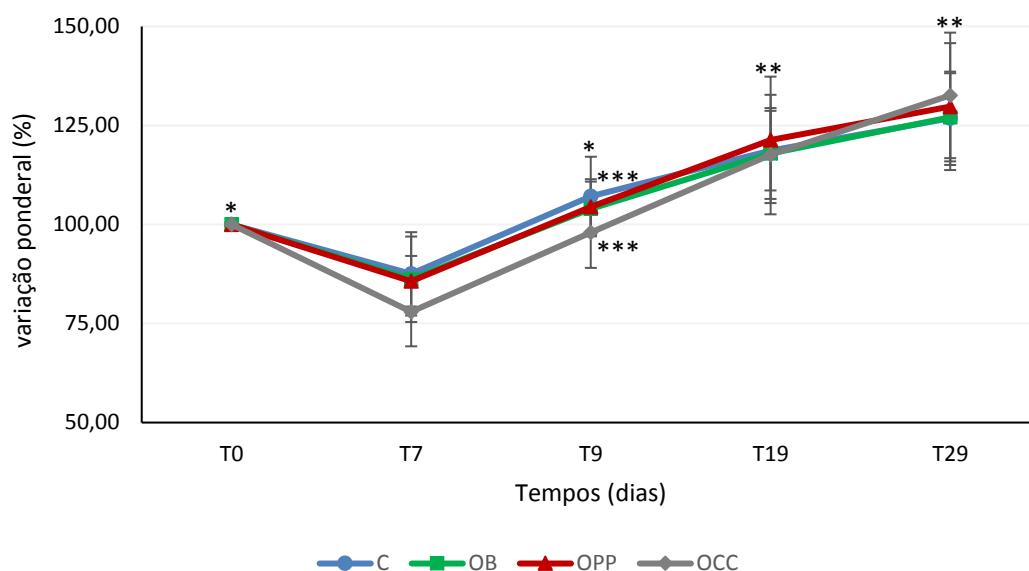
A utilização de “modelos animais humanizados” tem se mostrado uma boa estratégia para estudar o efeito de diferentes tratamentos na modulação da microbiota intestinal e a sua relação com saúde e doença. Tradicionalmente, esses modelos envolvem a colonização de camundongos *germ-free* com microrganismos procedentes de doadores humanos. Entretanto, a manutenção de animais *germ-free* implica em altos investimentos em estrutura e mão-de-obra, além de não estar disponível na maioria dos centros de pesquisa. Um modelo economicamente mais viável e com resultados semelhantes, consiste na depleção da microbiota intestinal com o uso de coquetel de ATB, seguida de recolonização via TMF. Diferentes combinações de ATB têm sido testadas, sendo a mistura ampicilina, neomicina, metronidazol e vancomicina a mais utilizada, por atuar em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e anaeróbicas (REIKVAM et

al., 2011; HINTZE et al., 2014; KENNEDY; KING; BALDRIDGE, 2018; TIRELLE et al., 2020). A forma de administração e duração do tratamento também interferem na eficácia da depleção. Tirelle et al. (2020) concluíram que a administração da mistura de ATB por gavagem duas vezes ao dia ou dissolvida na água ofertada aos animais, por um período de quatro dias, induz a uma depleção consistente da microbiota intestinal. Por outro lado, a administração dos ATB uma vez ao dia, por gavagem, levou a uma hiperproliferação de bactérias dos gêneros *Escherichia* spp. e *Shigella* spp.

No presente estudo optamos pela administração do coquetel de ATB dissolvidos em água, para não causar estresse aos animais. Porém, no quarto dia do protocolo foi preciso oferecer água esterilizada e administrar o ATB por gavagem, pois os animais apresentaram sinais de desidratação.

A Figura 2 ilustra a variação ponderal dos animais durante as etapas de depleção da microbiota intestinal e recolonização por TMF.

**Figura 2.** Variação ponderal dos animais dos diferentes grupos experimentais, durante as etapas de depleção da microbiota intestinal e recolonização por TMF.



Tempos (dias): T0 - início do protocolo; T7 - final da depleção da microbiota intestinal; T9 - final do intervalo para recuperação dos animais; T19 - final da recolonização da microbiota intestinal (TMF) e T29 - estabilização da microbiota intestinal. **C**: controle sem indução da obesidade; **OB**: obesidade induzida por DHL e sem tratamento; **OPP**: obesidade induzida por DHL e que receberam o tratamento personalizado; **OCC**: obesidade induzida por DHL e que receberam as cepas compartilhadas (tratamento não personalizado). Dados apresentados como (média±DP). \* diferença entre tempos para os grupos OB, OPP e OCC, \*\* diferença entre tempos para o grupo C, \*\*\* diferença entre os grupos C e OCC, pela ANOVA mistas e pós-teste de *Sidak* ( $p<0,05$ ).

Os animais de todos os grupos de estudo foram submetidos a procedimentos idênticos, e na comparação entre grupos houve diferença significativa apenas entre C e OCC no T9 ( $p<0,05$ ). Na comparação entre tempos os únicos grupos que não evidenciaram diferenças significativas foram o grupo C (T0 – T9,  $p>0,05$ ) e os grupos OB, OPP e OCC (T19 – T29,  $p>0,05$ ).

Apesar do protocolo de depleção da microbiota intestinal pelo uso de ATB ser amplamente utilizado e sem efeitos adversos graves relatados (MANICHANH et al., 2010; REIKVAM et al., 2011; HINTZE et al., 2014;

SHEN et al., 2015; KENNEDY et al., 2018; TIRELLE et al., 2020), os animais do nosso estudo apresentaram, além dos sinais de desidratação, perda de peso (Figura 2) e prolapso retal (Figura 3). Ainda, dez camundongos não resistiram ao tratamento, vindo a óbito ou sendo sacrificados por apresentarem sinais de sofrimento (postura arqueada, pelos eriçados e perda de peso acentuada). Os dez animais foram repostos, para não prejudicar o protocolo experimental.

Uma possível explicação para o ocorrido seria a seleção e posterior proliferação de bactérias patogênicas resistentes aos ATB. Apesar do protocolo utilizar animais SPF e seguir todos os critérios estabelecidos para evitar contaminação (uso de estante com filtro, água e ração esterilizadas, caixas higienizadas com álcool 70° GL e maravalha autoclavada), os animais tiveram contato com o meio externo no momento da manipulação (pesagem e troca de caixas). A diversidade da microbiota intestinal é considerada um fator de proteção contra bactérias resistentes, enquanto o uso de ATB leva a uma alteração nesse ecossistema, facilitando a reprodução de patógenos, que podem impactar a saúde dos animais (KENNEDY et al., 2018).

Um estudo conduzido por Goulding et al. (2021) com camundongos C57BL/6 fêmeas, avaliou uma nova combinação de ATB para reduzir a microbiota intestinal. Os ATB foram dissolvidos em água e ofertados aos animais durante oito dias na seguinte combinação: ampicilina/ neomicina/ metronidazol/vancomicina (grupo 4-AB); enrofloxacina/ampicilina (grupo 2-AB); ou água deionizada (grupo controle). Nos dias 1, 4 e 8 o grupo 4-AB

perdeu significativamente mais peso quando comparado com o controle, enquanto o grupo 2-AB mostrou perda de peso significativa comparado com o controle apenas no dia 1. Além da perda de peso, os autores relataram baixa palatabilidade e consumo de água pelos animais do grupo 4-AB, que foram retirados do estudo.

O TMF realizado a partir do nono dia do protocolo, além de possibilitar a recolonização dos animais com a microbiota fecal das crianças, simulando a microbiota humana, resultou em melhora na condição de saúde dos animais. Após o início do TMF (T9 a T19: cinco doses com intervalo de dois dias entre as administrações) observou-se reversão gradual da perda de peso (Figura 2) e do prolapso retal dos animais (Figura 3).

O TMF tem sido considerado uma boa estratégia para reverter a colonização por microrganismos resistentes que afetam pessoas imunossuprimidas ou não (LAGIER et al., 2015; BILINSKI et al., 2017; DINH et al., 2018) explicando, ao menos parcialmente, a melhora nas condições de saúde dos animais após o uso de ATB.

**Figura 3.** Imagem macroscópica dos animais após a depleção da microbiota intestinal pela administração do coquetel de ATB.

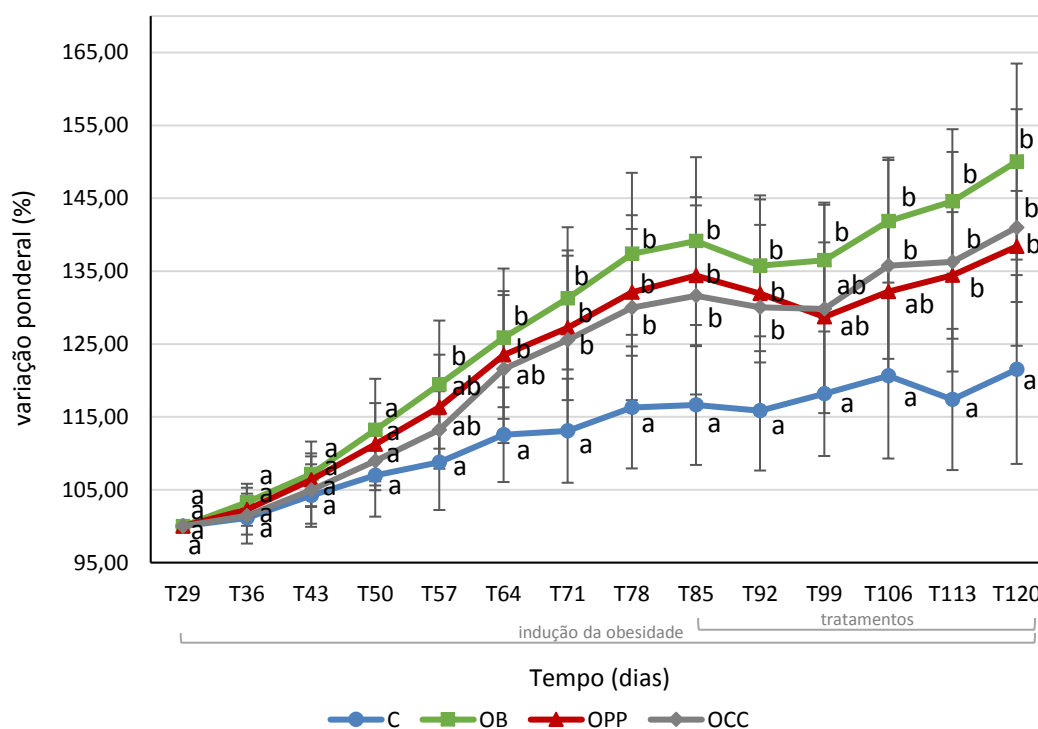


Prolapso retal (A) e após recolonização via TMF (B). **Fonte:** próprio autor.

## 7.2 Indução da Obesidade e Administração dos Tratamentos

Durante o período de indução da obesidade (T29 ao T120) houve um ganho de peso gradual nos grupos que receberam a DHL, sem diferença significativa entre eles em todos os tempos avaliados. A partir do T71 os animais induzidos à obesidade exibiram ganho de peso superior ao do controle, alimentado com dieta convencional (em média 20%) (Figura 4). Esse efeito era esperado, uma vez que os animais receberam somente a DHL, que possuiu um teor de lipídios superior e, conseqüentemente, forneceu um aporte energético maior.

**Figura 4.** Variação ponderal dos animais dos diferentes grupos experimentais, durante o protocolo de indução da obesidade.



**C:** controle sem indução da obesidade; **OB:** obesidade induzida por DHL e sem tratamento; **OPP:** obesidade induzida por DHL e que receberam o tratamento personalizado; **OCC:** obesidade induzida por DHL e que receberam as cepas compartilhadas (tratamento não personalizado). Dados apresentados como (média±DP). Letras diferentes entre grupos, no mesmo tempo de análise, indicam diferenças estatisticamente significativas pela ANOVA mista e pós-teste de *Sidak* ( $p < 0,05$ ).

O modelo de obesidade induzida por DHL é bastante utilizado para o estudo da progressão da doença, pois resulta em ganho de peso lento e progressivo e no desenvolvimento secundário de resistência à insulina (KLEINERT et al., 2018). Entretanto, fatores como linhagem, sexo e idade do animal e o tipo de dieta utilizada interferem no ganho de peso e nos efeitos metabólicos observados.

Camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6J são os mais utilizados, por apresentarem ganho de peso gradual e desenvolverem hiperlipidemia e resistência à insulina quando expostos à dieta obesogênica (WINZELL, AHRÉN, 2004; KLEINERT et al., 2018). No presente estudo, optou-se pela utilização da linhagem heterogênica Swiss (Unib: SW), que também desenvolve obesidade e alterações associadas, mas com maior variação nas respostas observadas. Por tratar-se de uma abordagem personalizada, cujo efeito pode variar em função das características genéticas do indivíduo, esse modelo se mostrou mais apropriado.

Na Figura 4 ainda é possível observar a variação de peso dos animais nas cinco semanas de tratamento (T85 a T120). Nesse período, não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos alimentados com a DHL, independentemente do tratamento recebido ( $p>0.05$ ). Entretanto, os animais que receberam as cepas personalizadas (OPP) apresentaram variação ponderal semelhante ao do controle (C) na terceira semana de estudo (T99 e T106), sugerindo um efeito benéfico do tratamento personalizado no controle do ganho de peso.

Em geral, é necessário um tempo maior de ingestão regular de probióticos para que os efeitos benéficos no ganho de peso sejam observados. Park et al. (2013) avaliaram o efeito de *Latilactobacillus curvatus* HY7601 (antes *Lactobacillus curvatus* HY7601) e *Lactiplantibacillus plantarum* KY1032 (antes *Lactobacillus plantarum* KY1032) no desenvolvimento da obesidade induzida por dieta em camundongos C57BL/6J. A obesidade foi induzida por oito semanas e os efeitos positivos no ganho de peso tornaram-se significativos após três semanas de tratamento com a mistura de probióticos. Estudos clínicos também utilizam protocolos mais longos para avaliar os efeitos de probióticos na variação de peso corporal dos voluntários (12 a 16 semanas) (MINAMI et al., 2015, CANFORA et al., 2017, NICOLUCCI et al., 2017, SERGEEV et al., 2020).

O objetivo principal da ingestão de probióticos é a modulação da microbiota intestinal que, por sua vez, vai impactar na permeabilidade intestinal, produção de hormônios da saciedade e de AGCC, atuando dessa forma no controle da obesidade (SILVA et al., 2021). Considerando que a microbiota humana é resiliente e que os processos metabólicos associados a essa comunidade são complexos, justifica-se a utilização de protocolos longos para a avaliação da obesidade.

### 7.3 Consumo alimentar e CEA

Os resultados de consumo alimentar e CEA obtidos durante o período de indução da obesidade são apresentados na Tabela 4.

O grupo que recebeu a dieta comercial padrão (grupo C), exibiu consumo diário de ração significativamente superior aos grupos que receberam DHL (OB, OPP e OCC).

**Tabela 4.** Consumo alimentar e CEA durante o protocolo de indução da obesidade.

| Grupos | Ingesta de ração (g)   | CEA (g/g)              |
|--------|------------------------|------------------------|
| C      | 6,68±0,20 <sup>b</sup> | 0,02±0,02 <sup>a</sup> |
| OB     | 4,82±0,41 <sup>a</sup> | 0,08±0,03 <sup>b</sup> |
| OPP    | 4,79±0,35 <sup>a</sup> | 0,07±0,02 <sup>b</sup> |
| OCC    | 4,88±0,55 <sup>a</sup> | 0,08±0,03 <sup>b</sup> |

**C:** controle sem indução da obesidade; **OB:** obesidade induzida por DHL e sem tratamento; **OPP:** obesidade induzida por DHL e que receberam o tratamento personalizado; **OCC:** obesidade induzida por DHL e que receberam as cepas compartilhadas (tratamento não personalizado). Dados apresentados como (média±DP). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna (comparação entre grupos) indicam diferenças estatisticamente significativas pela ANOVA e pós-teste de *Tukey* ( $p<0,05$ ) para ingesta de ração e ANOVA e pós-teste de *Games-Howell* ( $p<0,05$ ) para CEA.

O CEA, que representa a relação entre o total de peso ganho (g) e a quantidade ingerida de um determinado tipo de dieta (g), foi utilizado como indicador da eficácia alimentar. Apesar dos animais dos grupos OB, OPP e OCC ingerirem menor quantidade diária de ração (média de -27,69%), apresentaram CEA superior ao do grupo controle ( $p<0,05$ ). Esse resultado era esperado, pois a DHL possui teor calórico superior ao da dieta convencional e confirma a sua eficácia em promover maior ganho de peso.

As DHL utilizadas para induzir a obesidade, geralmente fornecem entre 45 e 60% de calorias provenientes de gorduras (MOURA E DIAS et al., 2021). Neste estudo 58,31% do VET da dieta foi proveniente de gordura,

principalmente de gordura saturada, garantindo um elevado aporte energético e ganho de peso.

Além do maior aporte calórico, relacionado ao elevado teor lipídico da DHL, a redução na locomoção e consequentemente menor gasto energético, observados em animais obesos, pode ter influenciado os valores do CEA (BROWNLOW et al., 1996).

#### 7.4 Glicemia de jejum

A glicemia de jejum foi aferida no T85 e T120 sendo estatisticamente diferente apenas para o grupo OCC no T120, na comparação entre grupos e tempos ( $p < 0,05$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Glicemia de jejum (T85 e T120) (mg/dL) dos animais dos diferentes grupos experimentais.

| Grupos | Glicemia de jejum (mg/dL)  |                             |
|--------|----------------------------|-----------------------------|
|        | T85                        | T120                        |
| C      | 123,40±24,35 <sup>aA</sup> | 123,60±19,40 <sup>aA</sup>  |
| OB     | 158,50±44,04 <sup>aA</sup> | 139,60±25,68 <sup>aA</sup>  |
| OPP    | 154,60±34,58 <sup>aA</sup> | 154,07±24,84 <sup>abA</sup> |
| OCC    | 145,62±47,47 <sup>aA</sup> | 188,69±64,48 <sup>bB</sup>  |

**C:** controle sem indução da obesidade; **OB:** obesidade induzida por DHL e sem tratamento; **OPP:** obesidade induzida por DHL e que receberam o tratamento personalizado; **OCC:** obesidade induzida por DHL e que receberam as cepas compartilhadas (tratamento não personalizado). Dados apresentados como (média ± DP). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna (comparação entre grupos) e letras maiúsculas diferentes na mesma linha (comparação entre tempos) indicam diferenças estatisticamente significativas pela ANOVA mista e pós-teste de Sidak ( $p < 0,05$ ).

A obesidade é frequentemente associada ao metabolismo anormal da glicose, com aumento na glicemia de jejum, que pode ser constatada antes do estabelecimento de um quadro de Diabetes tipo 2. Entretanto, em alguns casos pode ocorrer aumento compensatório e transitório de secreção de insulina, para normalizar os níveis de glicemia, o que pode explicar os resultados obtidos em nosso experimento (ASSUNÇÃO et al., 2018).

Em um estudo realizado por Yang et al. (2022), foi proposta a utilização de um novo probiótico (*Clostridium cochlearium*) para auxiliar no controle do ganho de peso e da glicemia em camundongos C57BL/6 alimentados com DHL (5,24 kcal por grama). O experimento teve duração de 17 semanas e, contrastando com os nossos resultados, na quinta semana, o grupo alimentado com DHL *ad libitum* e tratado com *C. cochlearium* (2.10<sup>9</sup> UFC/dia), apresentou redução na glicemia de jejum em comparação ao grupo que recebeu apenas DHL. A diferença foi estatisticamente significativa a partir da oitava semana, persistindo até o final do protocolo. O estudo evidenciou ainda que a suplementação dietética com *C. cochlearium* foi capaz de reduzir o ganho de peso corporal e melhorar a sensibilidade à insulina dos camundongos obesos. Diferenças na cepas e no protocolo experimental podem explicar a superioridade dos resultados obtidos neste estudo.

#### 7.5 Determinação de CT e frações

O consumo de DHL é capaz de aumentar os níveis séricos de CT, TG e LDLc e reduzir os níveis de HDLc (MONTSERRAT-DE LA PAZ et al.,

2021). Os valores do não HDLc, estimam as frações de lipoproteínas potencialmente aterogênicas plasmáticas, principalmente em indivíduos com TG elevado (VIRANI, 2011).

A variação no perfil lipídico dos diferentes grupos experimentais é apresentada na Tabela 6. Todos os grupos que receberam DHL apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de CT em comparação ao controle (C), porém esse efeito foi significativo somente para os OB e OCC. O grupo controle apresentou concentração de TG superior, sem diferir dos grupos tratados com as cepas personalizadas e compartilhadas. Os níveis de HDL foram superiores para o grupo OCC, diferindo estatisticamente dos grupos C e OB ( $p < 0,05$ ). O nível de não HDLc, que indica a concentração de partículas potencialmente aterogênicas, foi inferior para o grupo OPP, que diferiu estatisticamente do OB ( $p < 0,05$ ).

Os animais alimentados com DHL apresentaram níveis reduzidos de TG quando comparado ao grupo C, uma explicação para esse resultado seria o aumento da adiposidade proveniente da ingestão da dieta rica em gordura (58,31% do VET), e o posterior armazenamento ectópico no fígado, músculo e pâncreas (gordura ectópica) (GUO et al. 2009).

**Tabela 6.** Níveis de lipídeos plasmáticos (mg/dL) dos animais dos diferentes grupos experimentais.

| Grupos | CT<br>(mg/dL)             | TG<br>(mg/dL)             | HDL<br>(mg/dL)             | não HDLc<br>(mg/dL)       |
|--------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| C      | 135,75±8,81 <sup>a</sup>  | 80,14±11,95 <sup>b</sup>  | 92,36±14,20 <sup>a</sup>   | 43,39±9,50 <sup>ab</sup>  |
| OB     | 160,54±13,57 <sup>b</sup> | 52,50±12,55 <sup>a</sup>  | 94,08±14,53 <sup>a</sup>   | 66,46±17,92 <sup>b</sup>  |
| OPP    | 154,10±4,26 <sup>ab</sup> | 60,02±2,82 <sup>ab</sup>  | 113,07±13,48 <sup>ab</sup> | 41,04±17,27 <sup>a</sup>  |
| OCC    | 162,41±19,40 <sup>b</sup> | 62,00±19,06 <sup>ab</sup> | 118,45±11,69 <sup>b</sup>  | 43,96±16,48 <sup>ab</sup> |

**C:** controle sem indução da obesidade; **OB:** obesidade induzida por DHL e sem tratamento; **OPP:** obesidade induzida por DHL e que receberam o tratamento personalizado; **OCC:** obesidade induzida por DHL e que receberam as cepas compartilhadas (tratamento não personalizado). Dados apresentados como (média ± DP). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna (comparação entre grupos) indicam diferenças estatisticamente significativas pela ANOVA e pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Choi et al. (2018) investigaram o efeito sinérgico de prebióticos (alulose) e probióticos (*Latilactobacillus sakei* LS03 - antes *Lactobacillus sakei* e *Leuconostoc kimchi* GJ2) no controle da obesidade e modulação do perfil lipídico. Segundo os autores, a ingestão de DHL levou a um aumento significativo de CT, TG, HDLc e não HDLc no plasma, quando comparados ao grupo que recebeu dieta normal. Nos grupos que receberam DHL + tratamentos (*Leuconostoc kimchi* GJ2; alulose e alulose + *Latilactobacillus sakei* LS03) foi observada uma redução significativa dos níveis plasmáticos de TG e não HDLc, em relação ao grupo que consumiu DHL. Em nosso estudo, tal comparação (grupo C e OB) evidenciou diferença significativa apenas para os níveis de CT e TG ( $p < 0,05$ ).

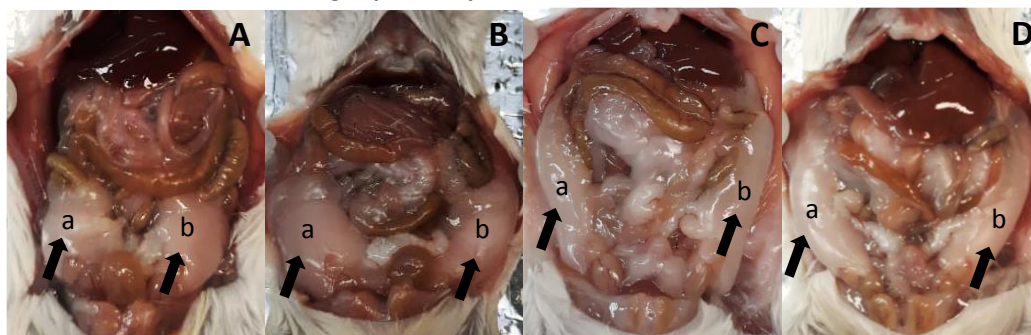
Em camundongos a lipoproteína HDL é mais abundante quando comparada ao LDL, e sua redução nos níveis plasmáticos podem afetar a função endotelial, levando ao desenvolvimento de aterosclerose (VOHRA et al., 2006; VAISMAN et al., 2012).

A ingestão das cepas personalizadas melhorou o perfil lipídico dos animais, que exibiram níveis de não HDL-c semelhantes aos dos animais que não foram induzidos à obesidade. O mecanismo de ação das cepas potencialmente probióticas envolve a assimilação ou incorporação de colesterol na membrana celular; desconjugação de ácidos biliares pela ação da enzima hidrolase de sais biliares (ácidos biliares desconjugados são menos solúveis e pouco absorvidos no intestino, sendo excretados nas fezes) e fermentação de carboidratos não digeríveis da dieta, produzindo AGCC, envolvidos no metabolismo do colesterol, via aumento da excreção de Apolipoproteína-A (PEREIRA; MCCARTNEY; GIBSON, 2003).

#### *7.6 Avaliação do tecido adiposo*

A administração das DHL com alto teor de lipídeos (58,31% do VET), contribuiu com o aumento da adiposidade intra-abdominal nos grupos OB, OPP e OCC (Figura 5), em comparação ao grupo C (que recebeu dieta convencional). Apesar do grupo OPP apresentar um menor acúmulo de gordura epididimal e retroperitoneal, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos induzidos à obesidade ( $p > 0,05$ ) (Tabela 7).

**Figura 5.** Imagens representativas da região intra-abdominal dos animais dos diferentes grupos experimentais.



As setas indicam a gordura intra-abdominal epididimal direita (a) e esquerda (b). A: Grupo C (controle sem indução da obesidade); B: Grupo OB (obesidade induzida por DHL e sem tratamento); C: Grupo OPP (obesidade induzida por DHL e que receberam o tratamento personalizado); D: Grupo OCC (obesidade induzida por DHL e que receberam as cepas compartilhadas). **Fonte:** próprio autor.

**Tabela 7.** Peso total do tecido adiposo epididimal e retroperitoneal dos diferentes grupos experimentais.

| Grupos | Tecido adiposo         |                           |
|--------|------------------------|---------------------------|
|        | Epididimal total (g)   | Retroperitoneal total (g) |
| C      | 1,27±0,42 <sup>a</sup> | 0,50±0,19 <sup>a</sup>    |
| OB     | 2,53±0,67 <sup>b</sup> | 0,93±0,30 <sup>b</sup>    |
| OPP    | 2,26±0,78 <sup>b</sup> | 0,87±0,20 <sup>b</sup>    |
| OCC    | 2,33±0,76 <sup>b</sup> | 1,27±0,70 <sup>b</sup>    |

**C:** controle sem indução da obesidade; **OB:** obesidade induzida por DHL e sem tratamento; **OPP:** obesidade induzida por DHL e que receberam o tratamento personalizado; **OCC:** obesidade induzida por DHL e que receberam as cepas compartilhadas (tratamento não personalizado). Dados apresentados como (média±DP). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna (comparação entre grupos) indicam diferenças estatisticamente significativas pela ANOVA e pós-teste de *Tukey* ( $p<0,05$ ) para tecido adiposo epididimal e ANOVA e pós-teste de *Games-Howell* ( $p<0,05$ ) para tecido adiposo retroperitoneal.

Relatos de estudos anteriores demonstram que camundongos alimentados com DHL apresentam aumento de peso corporal rápido e gradual nas primeiras 12-24 semanas, e que a exposição até 40 semanas leva a um aumento pouco significativo (VAN DER HEIJDEN et al., 2015),

favorecendo o acúmulo desordenado de lipídios, uma vez que a obesidade está associada à hipertrofia dos adipócitos (aumento de tamanho).

O tecido adiposo é composto por células adiposas ou adipócitos diferenciando-se nos seguintes tipos: branco, marrom e bege. O tecido adiposo branco é o principal responsável pelo armazenamento de energia na forma de TG, pela liberação de ácidos graxos durante os períodos de jejum, secreção hormonal, controle do metabolismo da glicose e função imunológica, localizando-se principalmente em dois locais, tecido adiposo subcutâneo e visceral. Os adipócitos da gordura visceral ao redor dos órgãos internos são metabolicamente mais ativos do que os do tecido adiposo subcutâneo e, portanto, contribuem para os riscos de doenças cardiovasculares e diabetes mellitus tipo 2. O tecido adiposo marrom está envolvido na termogênese e é encontrado principalmente acima da clavícula e escápula em adultos. A exposição exagerada a DHL tem a capacidade de modificar a cor do tecido adiposo de marrom para branco, em um processo denominado clareamento do tecido adiposo, contribuindo com a inflamação relacionada à obesidade (KOTZBECK et al., 2018).

A análise histológica das células adiposas, indicou diferenças estatísticas significativas para área e diâmetro das células dos animais induzidos à obesidade, quando comparados ao grupo controle que recebeu apenas dieta convencional. Dentre os grupos que receberam os tratamentos, apenas o OPP exibiu área e diâmetro do tecido adiposo epididimal inferiores ao grupo induzido à obesidade e sem tratamento (OB) ( $p < 0,05$ ) (Tabela 8 e Figura 6).

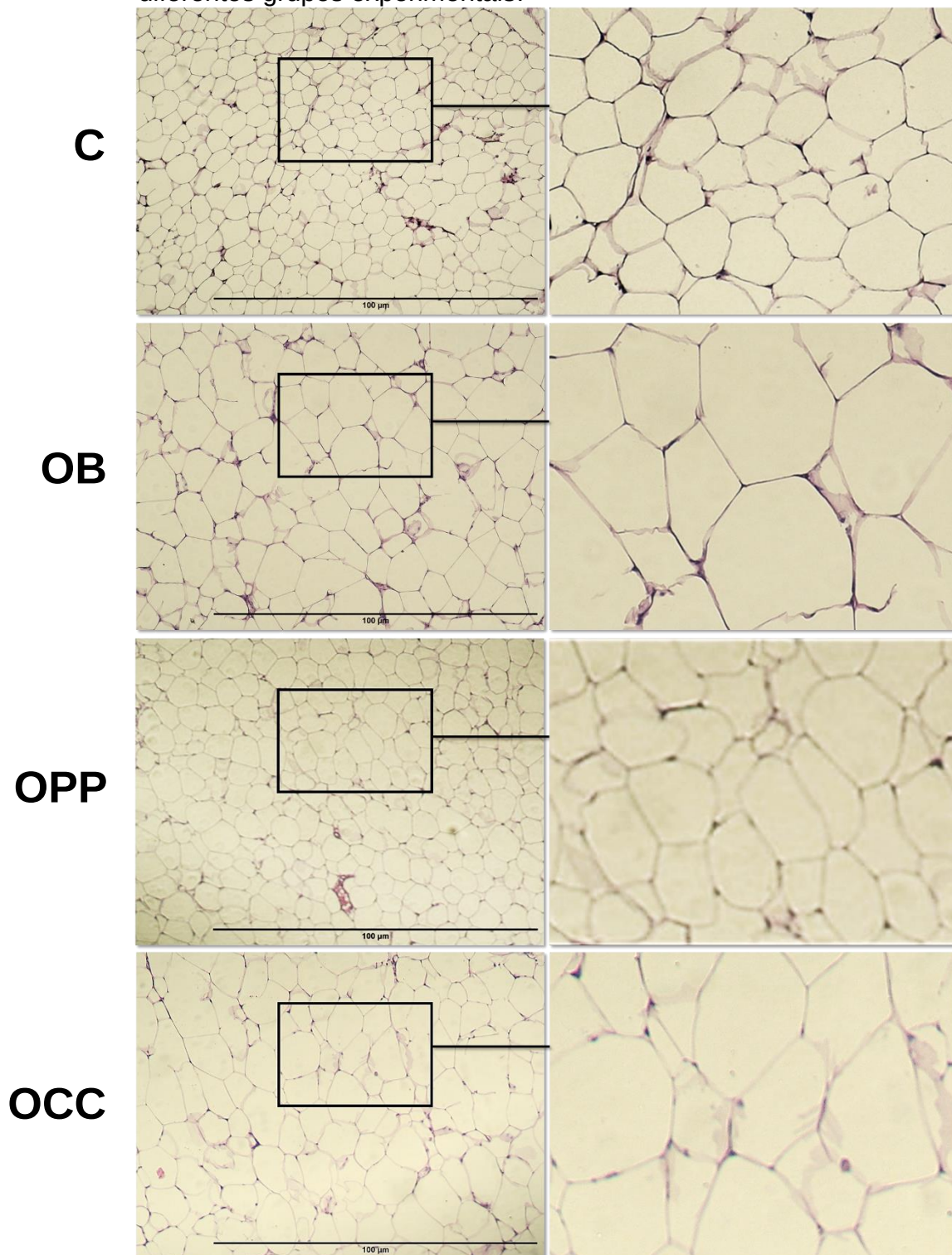
**Tabela 8.** Área e diâmetro do tecido adiposo epididimal dos diferentes grupos experimentais.

| Grupos | Tecido adiposo epididimal |                            |
|--------|---------------------------|----------------------------|
|        | Área ( $\mu\text{m}^2$ )  | Diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) |
| C      | 34,51±14,75 <sup>a</sup>  | 6,42±1,51 <sup>a</sup>     |
| OB     | 69,28±32,75 <sup>c</sup>  | 11,15±2,77 <sup>c</sup>    |
| OPP    | 48,80±23,14 <sup>b</sup>  | 9,31±2,25 <sup>b</sup>     |
| OCC    | 66,95±30,07 <sup>c</sup>  | 11,71±2,58 <sup>c</sup>    |

**C:** controle sem indução da obesidade; **OB:** obesidade induzida por DHL e sem tratamento; **OPP:** obesidade induzida por DHL e que receberam o tratamento personalizado; **OCC:** obesidade induzida por DHL e que receberam as cepas compartilhadas (tratamento não personalizado). Dados apresentados como (média±DP). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna (comparação entre grupos) indicam diferenças estatisticamente significativas pela ANOVA e pós-teste de Tukey ( $p<0,05$ ) para a área do tecido adiposo epididimal e ANOVA e pós-teste de Games-Howell ( $p<0,05$ ) para o diâmetro do tecido adiposo epididimal.

O crescimento do tecido adiposo está relacionado à hiperplasia (aumento do número de células) e hipertrofia (aumento do tamanho das células) dos adipócitos. A hipertrofia consiste no remodelamento do adipócito para atender ao aumento da demanda de armazenamento de gordura. No entanto, a relação entre dieta e hiperplasia e/ou hipertrofia das células adiposas não é totalmente compreendida, pois os estudos que avaliaram as mudanças no tecido adiposo ao longo do tempo são limitados (JO et al., 2009).

**Figura 6.** Fotomicrografia do tecido adiposo epididimal dos diferentes grupos experimentais.



**C:** controle sem indução da obesidade; **OB:** obesidade induzida por DHL e sem tratamento; **OPP:** obesidade induzida por DHL e que receberam o tratamento personalizado; **OCC:** obesidade induzida por DHL e que receberam as cepas compartilhadas (tratamento não personalizado). **Fonte:** próprio autor.

Alguns artigos publicados recentemente que também isolaram cepas bacterianas da microbiota humana, porém distintas das cepas utilizadas nesse estudos e verificaram o efeito das mesmas na obesidade induzida por DHL obtiveram resultados promissores. Le Roy et al. (2021) investigaram a abundância e a prevalência de *Dysosmobacter welbionis* J115<sup>T</sup>, uma nova bactéria produtora de butirato isolada do intestino humano da população em geral e de indivíduos com síndrome metabólica. O objetivo do estudo foi verificar o impacto da bactéria no metabolismo de camundongos com obesidade. A suplementação com *D. welbionis* J115<sup>T</sup> reduziu o desenvolvimento da obesidade e o aumento dos adipócitos, esses achados corroboraram com nossos resultados; além disso, a administração da nova cepa reduziu a resistência à insulina e a inflamação do tecido adiposo branco.

Em um outro estudo realizado por Mazier et al. (2021) foi verificado o potencial antiobesidade de uma nova cepa de *Christensenella minuta* em modelos pré-clínicos. A cepa DSM33407 foi isolada da amostra fecal de um doador com idade <35 anos, e o estudo foi conduzido em 120 camundongos C57Bl/6J. A administração da *C. minuta* DSM33407 preveniu o ganho de peso corporal e a hiperglicemia, além de reduzir significativamente a hipertrofia do tecido adiposo branco mesentérico, quando oferecida aos animais por 40 dias. Resultado semelhante foi encontrado em nosso estudo para a área e o diâmetro tecido adiposo epididimal, após a administração do tratamento personalizado durante 35 dias.

### *7.7 Determinação de citocinas*

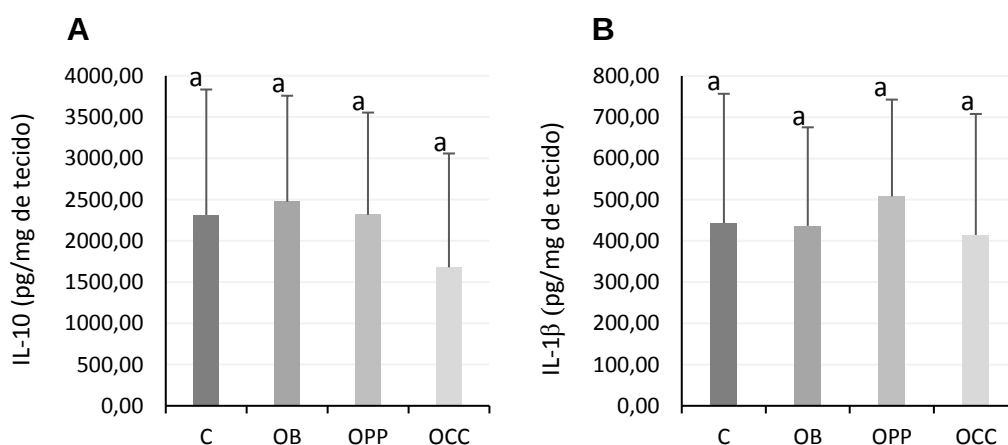
Os fatores de crescimento, as citocinas pró-inflamatórias, conhecidas como adipocinas ou adipocitocinas (leptina, resistina, dentre outras) e as citocinas anti-inflamatórias (hormônio adiponectina) são substâncias secretadas pelo tecido adiposo branco, e exercem papel importante na homeostase energética e inflamação. Além disso, essas inúmeras funções tornam o tecido adiposo branco um órgão endócrino. Em pessoas magras, o tecido adiposo produz adipocinas anti-inflamatórias, adiponectina e IL-10. Entretanto, quando a obesidade está presente, ocorre uma série de respostas inflamatórias devido ao aumento da secreção de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  (PAHLAVANI et al., 2017), pois a ingestão de DHL aumenta os fatores pró-inflamatórios no tecido adiposo branco (GARCIA et al., 2021).

Em casos de obesidade pode ocorrer inflamações crônicas, e os macrófagos são células que exercem papel importante, embora também estejam presentes no tecido adiposo de indivíduos magros, ainda que em níveis menores quando comparados ao tecido adiposo de pessoas portadoras de obesidade (WEISBERG et al., 2003; XU et al., 2003). A elevação do fenótipo de macrófago no tecido adiposo é encontrada na obesidade independente de sua etiologia (HILL; REID BOLUS; HASTY, 2014) e tem a capacidade de prejudicar a função do tecido adiposo ocasionando resistência à insulina (XU et al., 2003; SHAPIRO et al., 2013); provocando a produção de quimiocinas e citocinas e/ou acometendo o tamanho dos adipócitos (CANCELLO et al., 2005).

O fenótipo de macrófagos é dividido em subconjuntos, podendo ser M1 e M2. O fenótipo M1 é conhecido por favorecer a inflamação e resistência à insulina e participar da síntese de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, entre outras), o M2 está envolvido na homeostase do tecido adiposo e síntese de citocinas anti-inflamatórias (IL-10, TGF- $\beta$ , entre outras) (HILL; REID BOLUS; HASTY, 2014).

No presente estudo foram investigadas as concentrações das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ). Os valores obtidos para IL-1 $\beta$  e IL-10 são apresentados na Figura 7, enquanto as concentrações de TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  ficaram abaixo do limite de detecção do método utilizado, e por isso, não foram apresentadas.

**Figura 7.** Concentração de citocinas do tecido adiposo retroperitoneal dos diferentes grupos experimentais.



**(A)** Níveis de interleucina 10 (IL-10); **(B)** Níveis de Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ). **C:** controle sem indução da obesidade; **OB:** obesidade induzida por DHL e sem tratamento; **OPP:** obesidade induzida por DHL e que receberam o tratamento personalizado; **OCC:** obesidade induzida por DHL e que receberam as cepas compartilhadas (tratamento não personalizado). Dados apresentados como (média $\pm$ DP). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas pela ANOVA e pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Dentre os grupos avaliados, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para IL-10 e IL-1  $\beta$  ( $p>0,05$ ) (Figura 7). Resultados semelhantes foram obtidos por Li et al. (2020) que avaliaram o impacto de quatro linhagens de camundongos machos (*Kunming*, C57BL/6, BALB/c e ICR) no estudo da obesidade induzida por DHL. Todas as linhagens testadas responderam bem à indução da obesidade por DHL, mas não houve alteração nos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e MCP-1) e anti-inflamatória (IL-10) avaliadas.

Já em outro estudo realizado por Park, Oh, Cha (2020) foi investigado o papel da *Latilactobacillus brevis* OPK-3 (antes *Lactobacillus brevis* OPK-3) na redução do ganho de peso corporal e na resposta inflamatória do tecido adiposo de camundongos C57BL/6 machos. Os autores encontraram níveis séricos elevados das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  no grupo controle positivo (DHL e sem tratamento) quando comparado ao grupo controle negativo (dieta normal e sem tratamento). A suplementação com a cepa *L. brevis* OPK-3 foi capaz de impedir o aumento das citocinas pró-inflamatórias (TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ).

Lim et al. (2022) demonstraram o efeito do *Lactiplantibacillus plantarum* K8 (LAB-P) na obesidade e nas suas respostas inflamatórias, em camundongos obesos alimentados com DHL. As concentrações de citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6 foram analisadas no tecido adiposo epididimal por RT-PCR; os autores encontraram um aumento nos níveis de expressão de IL-1 $\beta$  e IL-6 no grupo alimentado com DHL quando comparado ao alimentado com dieta padrão. A administração de LAB-P (50 ou 100 mg/kg de peso corporal por

dia) diminuiu os níveis de expressão de IL-1 $\beta$  e IL-6 em comparação com o grupo alimento com DHL.

O tecido adiposo é responsável pela secreção de adipocinas envolvidas em processos fisiológicos como termorregulação e inflamação. Entre as adipocinas temos IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , e TNF- $\alpha$ , que juntamente com os hormônios leptina, adiponectina e insulina, encontram-se alterados na obesidade. Considerando a natureza inflamatória da obesidade, elevações nos níveis de citocinas inflamatórias são esperadas em animais cuja obesidade foi induzida por DHL, bem como em pacientes com obesidade (TRAYHURN; WOOD, 2004; WANG; NAKAYAMA, 2010; RAKOTOARIVELO et al., 2018). Entretanto, outros métodos como Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (*RT-PCR*) e *western blot*, parecem refletir o estado inflamatório com mais precisão nesse tipo de doença (MARTINEZ-FERNANDEZ 2017; RAKOTOARIVELO et al., 2018; THIENNIMITR et al., 2018), o que poderia explicar os resultados obtidos no presente estudo.

#### *7.8 Determinação da composição da microbiota fecal*

As amostras dos diferentes grupos estudados foram avaliadas através do sequenciamento dos genes 16S rRNA. A região V3-V4 do gene foi amplificada por PCR e os respectivos subprodutos purificados foram sequenciados na plataforma *Illumina MiSeq*. Na Figura 8 é possível verificar os resultados preliminares de abundância relativa dos filos encontrados nas amostras fecais dos grupos em estudo.

Em geral, no início do protocolo experimental (T0) houve a predominância dos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, seguido por *Proteobacteria* em todos os grupos experimentais. Isso já era esperado, uma vez que a microbiota intestinal das últimas porções do cólon é formada principalmente por tais filos (JANDHYALA et al., 2015; RIZZATTI et al., 2017).

A depleção da microbiota pelo uso de antibióticos (T7) levou a uma profunda alteração na composição da microbiota intestinal dos animais, expressa pela dominância de *Proteobacteria* e redução de *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. O filo *Proteobacteria* é representado principalmente por bactérias Gram negativas, como *Escherichia* spp., *Pseudomonas* spp. e outros gêneros potencialmente patogênicos. A abundância do gênero *Escherichia* (C: 29,95%; OB: 20,64%; OPP: 28,68; OCC: 22,70%) e *Pseudomonas* (C: 5,00%; OB: 4,52%; OPP: 4,45%; OCC: 4,62%) podem ser observadas na Figura 9 B. A composição da microbiota intestinal nessa fase do estudo explica a piora no estado geral dos animais (perda de peso e prolapso retal) e os óbitos observados.

No estudo realizado por Ma et al. (2022) foi utilizado o mesmo coquetel de antibióticos e os resultados mostraram redução na diversidade da microbiota intestinal, com predomínio do filo *Proteobacteria*, após vinte e um dias de tratamento. A fim de evitar o ocorrido, uma alternativa seria reduzir o tempo de tratamento, uma vez que estudos mostram que o coquetel de antibióticos usado tem o potencial de reduzir a carga bacteriana

presente nas fezes a partir o quarto dia e a administração por mais dias não intensifica essa diminuição (TIRELLE et al., 2020).

A recolonização da microbiota (T29) reestabeleceu o equilíbrio entre os principais filos presentes na microbiota intestinal, constatando-se novamente um predomínio de *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. Lembrando que os animais foram recolonizados com a microbiota humana (cada criança recolonizou 10 animais), justificando as diferenças observadas.

Suez et al. (2018) estudaram o efeito de três intervenções (probiótico, TMF autólogo e recuperação espontânea) na reconstituição da microbiota intestinal indígena de camundongos tratados com antibióticos. O TMF autólogo foi o mais eficiente na recuperação da diversidade bacteriana, enquanto o uso de probióticos e a recuperação espontânea não foram eficientes para reestabelecer a diversidade microbiana em até quatro semanas após a depleção da microbiota intestinal.

A ingestão de DHL alterou a relação *Firmicutes*: *Bacteroidetes* em todos os grupos induzidos à obesidade (OB, OPP e OCC) no final do T85 (indução da obesidade e sem tratamento), aumentando proporção de *Firmicutes* (OB: +34,75%, OPP +18,09% ; OCC: +28,81%) e reduzindo a de *Bacteroidetes* (OB: -19,57%, OPP: -12,76% ; OCC: -9,74%) (Figura 8). Efeito semelhante já foi verificado por outros autores (CARICILLI et al., 2011; KRAJMALNIK-BROWN et al., 2012; SWEENEY; MORTON, 2013; KOLIADA et al., 2017; QADIR; ASSAFI, 2021).

Após a administração dos tratamentos (T120), as cepas potencialmente probióticas personalizadas foram capazes de reverter o aumento de *Firmicutes* e a redução de *Bacteroidetes* (Figura 8).

Ainda, destaca-se um aumento no gênero *Akkermansia* spp., observado no final do estudo, no grupo que recebeu o tratamento personalizado (Figura 9). Esse efeito é considerado benéfico, pois a espécie *Akkermansia muciniphila* tem sido inversamente associada com quadros de resistência à insulina, diabetes e obesidade (REMELY et al., 2016). *A. muciniphila* é um microrganismo Gram negativo, pertencente ao filo Verrucomicrobia, que protege de doenças metabólicas via produção de AGCC (OTTOMAN et al., 2017) e aumento na oxidação de ácidos graxos no intestino e no tecido adiposo (LUKOVAC et al., 2014).

Kang et al. (2022) avaliaram o efeito do probiótico *Lactobacillus acidophilus* no controle da obesidade induzida por DHL e modulação das bactérias intestinais em camundongos. De acordo com os resultados obtidos, a ingestão de *L. acidophilus* pode reverter a disbiose intestinal causada pela DHL, efeito constatado pela redução da razão *Firmicutes*: *Bacteroidetes*. Além disso, a ingestão da cepa foi associada à melhora da hiperlipidemia, doença hepática gordurosa não alcoólica e resistência à insulina, devido as suas propriedades anti-inflamatórias.

Apesar do efeito benéfico no controle da obesidade atribuído a algumas cepas probióticas, ainda existe muita discussão sobre quais cepas teriam os melhores efeitos, a dose apropriada e a duração do tratamento. Essa discussão é suportada pelo fato dos resultados não serem

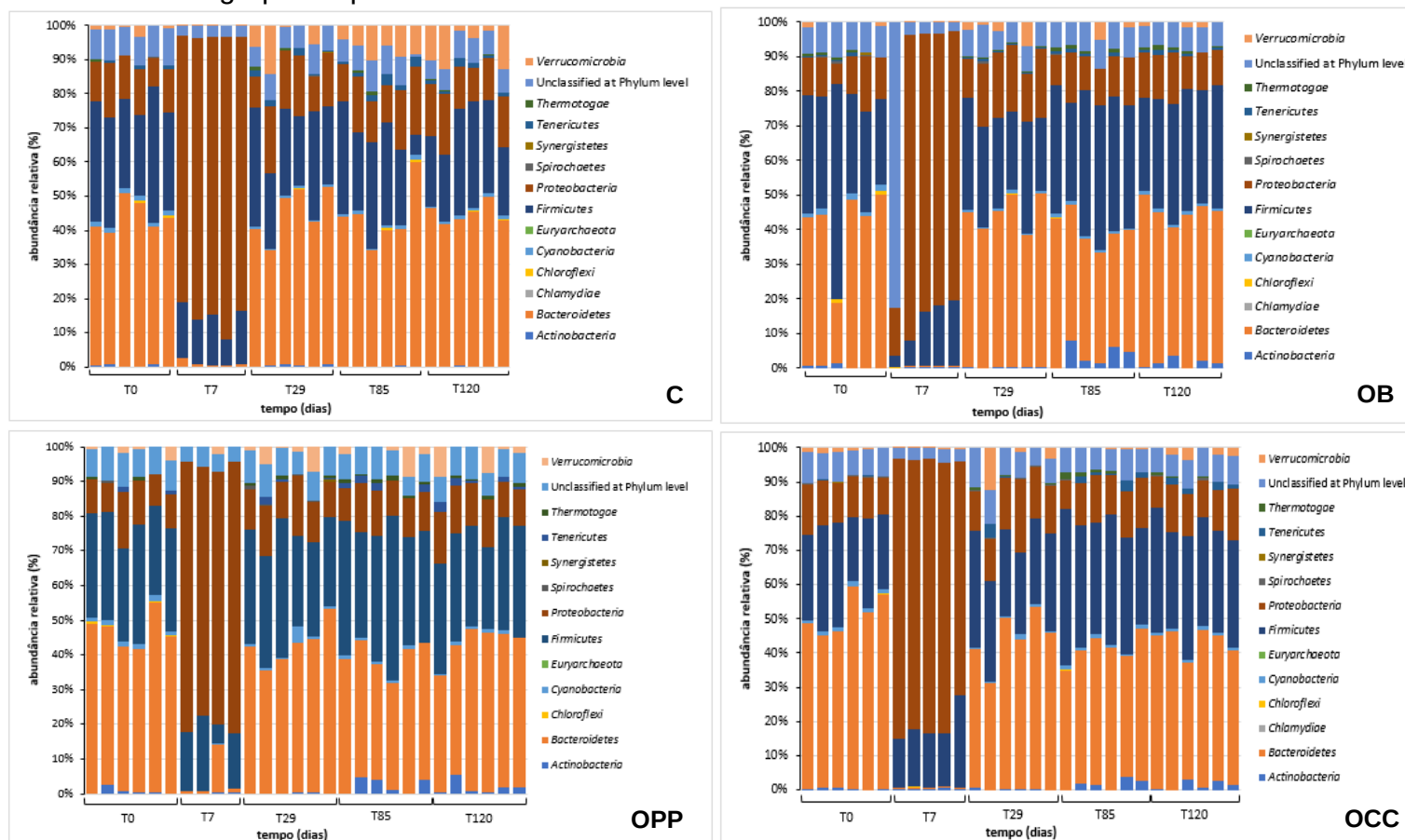
concordantes, mesmo quando se utiliza uma mesma espécie probiótica (JUNG-PIL et al., 2013; KADOOKA et al., 2013).

Os estudo que avaliaram o efeito da terapia personalizada no controle da obesidade são restritos e muitas vezes envolvem o TMF autólogo. Pérez-Matute et al. (2020) avaliaram o efeito do TMF, heterólogo e autólogo, associado à restrição calórica moderada na obesidade induzida em camundongos por HDL. O TMF autólogo potencializou os efeitos da restrição moderada de energia na perda de peso e adiposidade, provavelmente por reduzir a EA e aumentar a lipólise do tecido adiposo. Ainda, o TMF autólogo promoveu um aumento significativo na riqueza/diversidade bacteriana e modificações discretas nos gêneros *Bifidobacterium* spp. e *Blautia* spp.

Ermolenko et al. (2022) conduziram um estudo semelhante ao nosso, onde foi utilizada uma mistura de cepas denominadas autoprobióticas (*Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Bifidobacterium* spp.) para o tratamento de pacientes portadores de síndrome metabólica. As amostras fecais dos pacientes foram cultivadas em meios específicos e utilizadas para preparar uma bebida fermentada personalizada. Os pacientes receberam o tratamento personalizado duas vezes por dia, durante 10 dias. No final do estudo constatou-se diminuição dos parâmetros antropométricos de obesidade, correção dos níveis de enzimas hepáticas e redução das concentrações de proteína C reativa e TG. A microbiota intestinal exibiu diminuição de *Bifidobacterium* spp., *Enterobacter* spp., *Paraprevotella* spp. e *Prevotella* spp., e aumento de *Bacteroides fragilis* e *Oscillospira* spp.

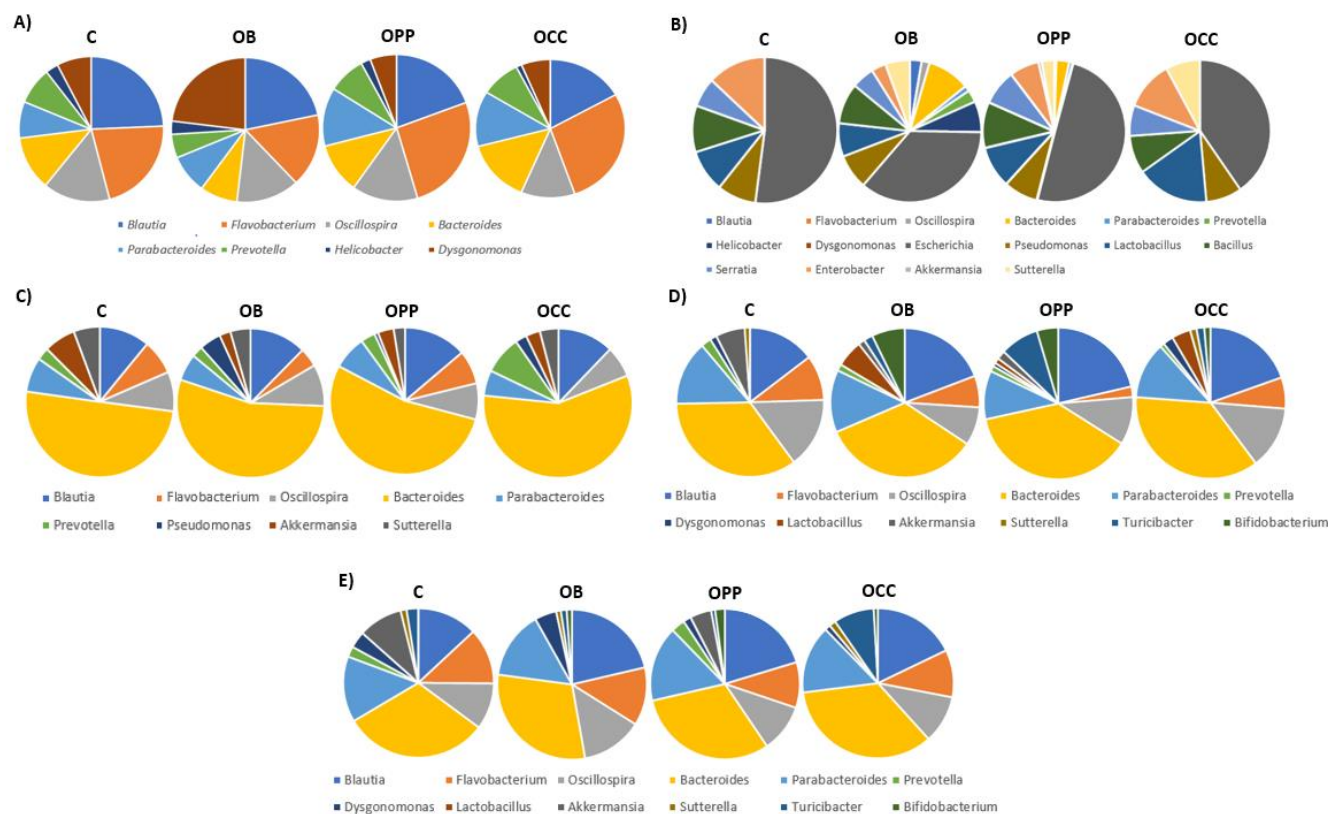
Apesar de ser uma estratégia recente, o tratamento personalizado com cepas potencialmente probióticas se mostra promissor e surge como uma opção para o tratamento de doenças relacionadas à disbiose, como a obesidade. No presente estudo os efeitos da terapia personalizada foram superiores aos da mistura de cepas potencialmente probióticas (OCC), provavelmente devido à compatibilidade com a microbiota intestinal do hospedeiro e a tolerância imunológica.

**Figura 8.** Abundância relativa dos filos em relação às bactérias totais presentes nas fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais.



**C:** controle sem indução da obesidade; **OB:** obesidade induzida por DHL e sem tratamento; **OPP:** obesidade induzida por DHL e que receberam o tratamento personalizado; **OCC:** obesidade induzida por DHL e que receberam as cepas compartilhadas (tratamento não personalizado). **Fonte:** próprio autor.

**Figura 9.** Abundância relativa dos gêneros em relação às bactérias totais presentes nas fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais.



**A)** tempo inicial (T0); **B)** após depleção da microbiota intestinal (T7); **C)** após recolonização da microbiota intestinal (T29); **D)** indução da obesidade (T85); **E)** após administração dos tratamentos (T120). **C:** controle sem indução da obesidade; **OB:** obesidade induzida por DHL e sem tratamento; **OPP:** obesidade induzida por DHL e que receberam o tratamento personalizado; **OCC:** obesidade induzida por DHL e que receberam as cepas compartilhadas (tratamento não personalizado). **Fonte:** próprio autor.

## 8 CONCLUSÃO

O protocolo de depleção da microbiota intestinal com o uso de coquetel de ATB mostrou-se agressivo e a recolonização com o uso de TMF reverteu o prolapso retal e a perda de peso observada nos camundongos, confirmando a importância da microbiota intestinal na manutenção da saúde. O ganho de peso durante o protocolo foi satisfatório e coerente com o tipo de dieta utilizada e os animais que receberam a DHL exibiram CEA superior ao dos animais alimentados com dieta convencional. A administração das cepas personalizadas durante cinco semanas sugeriu efeito benéfico no controle do ganho de peso dos animais na terceira semana de tratamento e melhorou os níveis séricos de não HDLc. Além disso, as cepas potencialmente probióticas foram capazes de reduzir significativamente a área e o diâmetro do tecido adiposo branco epididimal e controlar o aumento na proporção *Firmicutes: Bacteroidetes*, exibindo resultados superiores aos das cepas compartilhadas. Os resultados obtidos sinalizam que o uso da terapia personalizada pode auxiliar no controle da obesidade, com efeitos mais pronunciados que as demais cepas potencialmente probióticas.

## REFERÊNCIAS

- AL-ASSAL, K. et al. Gut microbiota and obesity. **Clinical Nutrition Experimental**, v. 20, n. 3, p. 60–4, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clnex.2018.03.001>
- AMABEBE, E. et al. Microbial dysbiosis-induced obesity: Role of gut microbiota in homoeostasis of energy metabolism. **British Journal of Nutrition**, v. 123, n. 10, p. 1127–1137, 2020. DOI: [10.1017/S0007114520000380](https://doi.org/10.1017/S0007114520000380)
- ARMOUGOM, F. et al. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and Methanogens in anorexic patients. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, p. 1–8, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007125>
- ARUMUGAM, M. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v. 473, n. 7346, p. 174–180, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature09944>
- ASSUNÇÃO, S. N. F. et al. Glucose alteration and insulin resistance in asymptomatic obese children and adolescents. **Jornal de Pediatria**, v. 94, n. 3, p. 268–272, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jped.2017.06.008>
- AZAD, M. A. K. et al. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. **BioMed Research International**, p. 1–8, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/9478630>
- BARBUTI, R. C. et al. Gut microbiota, prebiotics, probiotics, and synbiotics in gastrointestinal and liver diseases: Proceedings of a joint meeting of the Brazilian Society of Hepatology (SBH), Brazilian Nucleus for the Study of *Helicobacter pylori* and Microbiota (NBEHPM), and Brazilian Federation of Gastroenterology (FBG). **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 57, n. 4, p. 381–398, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0004-2803.202000000-72>
- BIBBÒ, S. et al. Fecal microbiota transplantation: screening and selection to choose the optimal donor. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 6, p. 1–14, 2020. DOI: [10.3390/jcm9061757](https://doi.org/10.3390/jcm9061757)
- BILINSKI, J. et al. Fecal microbiota transplantation in patients with blood disorders inhibits gut colonization with antibiotic-resistant bacteria: results of a prospective, single-center study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 3, p. 364–370, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cix252>
- 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. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0303-2>

BROWNLOW, B. S., et al. The role of motor activity in diet-induced obesity in C57BL/6J mice. **Physiology & Behavior**, v. 60, n. 1, p. 37–41, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(95\)02210-4](https://doi.org/10.1016/0031-9384(95)02210-4)

CAMMAROTA, G. et al. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. **Gut**, v. 66, n. 4, p. 569–80, 2017. DOI: [10.1136/gutjnl-2016-313017](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313017)

CANANI, R. B. et al. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 12, p. 1519–1528, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i12.1519>

CANCELLO, R. et al. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. **Diabetes**, v. 54, n. 8, p. 2277–2286, 2005. DOI: [10.2337/diabetes.54.8.2277](https://doi.org/10.2337/diabetes.54.8.2277)

CANFORA, E. E. et al. Supplementation of diet with galacto-oligosaccharides increases Bifidobacteria, but not insulin sensitivity, in obese prediabetic individuals. **Gastroenterology**, v. 153, n. 1, p. 7–97, 2017. DOI: [10.1053/j.gastro.2017.03.051](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.03.051)

CANI, P. D. et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. **Gut**, v. 58, n. 8, p. 1091–1103, 2009. DOI: [10.1136/gut.2008.165886](https://doi.org/10.1136/gut.2008.165886)

CANO, P. G. et al. *Bifidobacterium* CECT 7765 improves metabolic and immunological alterations associated with obesity in high-fat diet-fed mice. **Obesity Biology and Integrated Physiology**, v. 21, n. 11, p. 2310–2321, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/oby.20330>

CARDING, S. et al. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 26, p. 1–9, 2015. DOI: [10.3402/mehd.v26.26191](https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26191)

CARICILLI, A. M. et al. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in tlr 2 knockout mice. *PLoS Biol.*, v. 14, n. 5, p. 1, 2016. Retraction of: CARICILLI, A. M. et al. In: **PLoS Biology**, v. 9, n. 12, p. 1–21, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001212>

CARMAN, R. J. et al. In Vivo Selection of rifamycin-resistant *clostridium difficile* during rifaximin therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 6019–20, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00974-12>

CELIBERTO, L. S. et al. Isolation and characterization of potentially probiotic bacterial strains from mice: proof of concept for personalized

probiotics. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1–21, 2018. DOI: 10.3390/nu10111684

CHEN, W. et al. Butyrate-producing bacteria and the gut-heart axis in atherosclerosis. **Clinica Chimica Acta**, v. 507, p. 236–241, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.04.037>

CHOI, B. R. et al. Papel dos simbióticos contendo d -alulose na alteração da gordura corporal e lipídios hepáticos em camundongos obesos induzidos por dieta. **Nutrientes**, v. 10, n. 11, p. 1–14, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu10111797>

COSTEA, P. I. et al. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. **Nature Microbiology**. v. 3, n. 1, p. 8–16, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0072-8>

CROVESY, L.; MASTERSON, D.; ROSADO, E. L. Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review. **European journal of clinical nutrition**, v. 74, n. 9, p. 1251–1262, 2020. DOI: 10.1038/s41430-020-0607-6

CUEVAS-SIERRA, A. et al. Diet, gut microbiota, and obesity: links with host genetics and epigenetics and potential applications. **Advances in Nutrition**, v. 10, n. 9, p. S17–S30, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/advances/nmy078>

DEFILIPP, Z. et al. Drug-resistant *E. coli* bacteremia transmitted by fecal microbiota transplant. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 21, p. 2043–2050, 2019. DOI: 10.1056/NEJMoa1910437

DINH, A. et al. Clearance of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae vs vancomycin-resistant enterococci carriage after faecal microbiota transplant: a prospective comparative study. **Journal Hospital Infections**, v. 99, n. 4, p. 481–486, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.02.018>

ERMOLENKO, E. et al. Consortium of indigenous fecal bacteria in the treatment of metabolic syndrome. **Microorganisms**, v. 10, n. 8, p. 1574, 2022. DOI: 10.3390/microorganismos10081574

FANG, W. et al. Supplementation with sodium butyrate modulates the composition of the gut microbiota and ameliorates high-fat diet-induced obesity in mice. **The Journal of Nutrition**, v. 149, n. 5, p. 747–754, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/nxy324>

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. (2002). **Report of a Joint FAO/WHO...**; Ontario, Canada. April 30, May 1.

<[http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf)>

FERREIRA, A. P. S.; SZWARCOWALD, C. L.; DAMACENA, G. N. Prevalence of obesity and associated factors in the Brazilian population: a study of data from the 2013 National Health Survey. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 22, p. 1–14, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/1980-549720190024>

FODOR, A. A. et al. Rifaximin is associated with modest, transient decreases in multiple taxa in the gut microbiota of patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. **Gut Microbes**, v. 10, n. 1, p. 22–33, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1460013>

FU, X. et al. Nondigestible carbohydrates, butyrate, and butyrate-producing bacteria. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, p. 130–152, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1542587>

GARCIA, M. L. Retroperitoneal adipose tissue denervation improves cardiometabolic and autonomic dysfunction in a high fat diet model. **Life Sciences**, v. 283, p. 1–7, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119841>

GIROTTI, E.; ANDRADE, S.M.; CABRERA, M.A.S. Prevalência de obesidade abdominal em hipertensos cadastrados em uma Unidade de Saúde da Família. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 6, p. 754–62, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2010005000049>

GOULDING, D. R. et al. Comparative efficacy of two types of antibiotic mixtures in gut flora depletion in female C57BL/6 mice. **Comparative Medicine**, v. 71, n. 3, p. 203–209, 2021. DOI: 10.30802/AALAS-CM-21-000023

GORVITOVSKAIA, A.; HOLME, S. P.; HUSE, S. M. Interpreting Prevotella and Bacteroides as biomarkers of diet and lifestyle. **Microbiome**, v. 4, n. 15, p. 3–12, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0160-7>

GUO, J.; JOU, W.; GAVRILOVA, O.; HALL, K. D. Persistent diet-induced obesity in male C57BL/6 mice resulting from temporary obesogenic diets. **PloS One**, v. 4, n. 4, p. 1–9, 2009.

HAMILTON, M. et al. Standardized frozen preparation for transplantation of fecal microbiota for recurrent *Clostridium difficile* Infection. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 5, p. 761–767, 2012. DOI: 10.1038/ajg.2011.482

- HERLEMANN, D. P. et al. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. **The ISME Journal**, v. 5, n. 10, p. 1571-9, 2011. DOI: 10.1038/ismej.2011.41
- HILL, A. A.; REID BOLUS, W.; HASTY, A. H. A Decade of Progress in Adipose Tissue Macrophage Biology. **Immunological Reviews**, v. 262, n. 1, p. 134–152, 2014. DOI: 10.1111/imr.12216
- 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**, v. 11, p. 506–514, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- HINTZE, K. J. et al. Broad scope method for creating humanized animal models for animal health and disease research through antibiotic treatment and human fecal transfer. **Gut Microbes**, v. 5, n. 2, p. 183–91, 2014. DOI: <https://doi.org/10.4161/gmic.28403>
- HO, Y. H. et al. Daily intake of probiotics with high IFN- $\gamma$  /IL-10 ratio increases the cytotoxicity of human natural killer cells: A personalized probiotic approach. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/721505>
- JANDHYALA, S. M. et al. Role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 29, p. 8787-803, 2015. DOI: 10.3748/wjg.v21.i29.8787
- JO, J. et al. Hypertrophy and/or hyperplasia: dynamics of adipose tissue growth. **PLoS computational biology**, v. 5, n. 3, p. e1000324, 2009.
- JONSSON, A. L.; BÄCKHED, F. Role of gut microbiota in atherosclerosis. **Nature Reviews Cardiology**, v. 14, n. 2, p. 79–87, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.183>
- JUNG-PIL, S. 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, n. 2, p. 80–89, 2013. DOI: 10.4082/kjfm.2013.34.2.80
- KANG, Y. et al. Lactobacillus acidophilus ameliorates obesity in mice through modulation of gut microbiota dysbiosis and intestinal permeability. **Pharmacological Research**, v. 175, p. 1–20, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.106020>
- KADOOKA, Y. Effect of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in fermented milk on abdominal adiposity in adults in a randomised controlled trial. **British Journal of Nutrition**. v. 110, n. 9, p. 1696–1703, 2013. DOI: 10.1017/S0007114513001037

KENNEDY, E. A.; KING, K. Y.; BALDRIDGE, M. T. Mouse microbiota models: comparing germ-free mice and antibiotics treatment as tools for modifying gut bacteria. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1–16, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01534>

KIM, S. K. et al. Role of probiotics in human gut microbiome-associated diseases. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 1335–1340, 2019. DOI: <https://doi.org/10.4014/jmb.1906.06064>

KLINDWORTH, A. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 1–11, 2013. DOI: [10.1093/nar/gks808](https://doi.org/10.1093/nar/gks808)

KLEINERT, M. et al. Animal models of obesity and diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 3, p. 140–142, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.161>

KOLEVA, P. T.; BRIDGMAN, S. L.; KOZYRSKYJ, A. L. The infant gut microbiome: Evidence for obesity risk and dietary intervention. **Nutrients**, v. 7, n. 4, p. 2237–2260, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu7042237>

KOLIADA, A. et al. Association between body mass index and *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio in an adult Ukrainian population. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1–6, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1027-1>

KOTHARY, V. et al. Rifaximin resistance in escherichia coli associated with inflammatory bowel disease correlates with prior rifaximin use, mutations in *rpoB*, and Activity of Phe-Arg- $\beta$ -Naphthylamide-Inhibitable efflux pumps. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 2, p. 811–7, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.02163-12>

KOTZBECK, P. et al. Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation[S]. **Journal of Lipid Research**, v. 59, n. 5, p. 784–794, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1194/jlr.M079665>

KRAJMALNIK-BROWN, R. et al. Effects of gut microbes on nutrient absorption and energy regulation. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 27, n. 2, p. 201–14, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1177/0884533611436116>

LAGIER, J. C. et al. Faecal microbiota transplantation for stool decolonization of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal Hospital Infection**, v. 90, n. 2, p. 173–4, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.02.013>

LANE, T. E.; WU-HSIEH, B. A.; HOWARD, D. H. Gamma interferon cooperates with lipopolysaccharide to activate mouse splenic macrophages to an antihistoplasma state. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 4, p. 1468–1473, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.61.4.1468-1473.1993>

LENGFELDER, I. et al. Complex bacterial consortia reprogram the colitogenic activity of *Enterococcus faecalis* in a gnotobiotic mouse model of chronic, immune-mediated colitis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 1420, p. 1–18, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01420>

LE ROY, T. et al. *Dysosmobacter welbionis* is a newly isolated human commensal bacterium preventing diet- induced obesity and metabolic disorders in mice. **Gut microbiota**, v. 71, p. 534–543, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323778>

LI, J. et al. High fat diet induced obesity model using four strains of mice: Kunming, C57BL/6, BALB/c and ICR. **Experimental Animals**, v. 69, n. 3, p. 326–335, 2020. DOI: 10.1538/expanim.19-0148.

LI, Z. et al. Butyrate reduces appetite and activates brown adipose tissue via the gut-brain neural circuit. **Gut**, v. 67, n. 7, p. 1269–1279, 2018. DOI: 10.1136/gutjnl-2017-314050

LIM, J. J. et al. *Lactiplantibacillus plantarum* K8-based paraprobiotics prevents obesity and obesity-induced inflammatory responses in high fat diet-fed mice. **Food Research International**, v. 155, p. 1–10, 2022. DOI: 10.1016/j.foodres.2022.111066.

LUKOVAC, S. et al. Differential modulation by *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* of host peripheral lipid metabolism and histone acetylation in mouse gut organoids. **mBio - ASM Journals - American Society for Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 1–10, 2014. DOI: 10.1128/mBio.01438-14

MCDONALD, D. et al. An improved greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. **The ISME Journal**, v. 6, n. 3, p. 610–8, 2012. DOI: 10.1038/ismej.2011.139

MA, P. et al. Gut microbiota depletion by antibiotics ameliorates somatic neuropathic pain induced by nerve injury, chemotherapy, and diabetes in mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 19, n. 169, p. 1–18, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02523-w>

MANG, G. M. et al. A neuron-specific deletion of the MicroRNA-processing enzyme dicer induces severe but transient obesity in mice. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. 1–18, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116760>

MANICHANH, C. et al. Reshaping the gut microbiome with bacterial transplantation and antibiotic intake. **Genome Research**, v. 20, n. 10 p 1411-1419, 2010. DOI: 10.1101/gr.107987.110

MARCHESIN, J. C. et al. A soy-based probiotic drink modulates the microbiota and reduces body weight gain in diet-induced obese mice. **Journal of Functional Foods**, v. 48, p. 302-313, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.07.010>

MARTINEZ-FERNANDEZ, L. et al. Maresin 1 improves insulin sensitivity and attenuates adipose tissue inflammation in ob/ob and diet-induced obese mice. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 5, p. 2135-2145, 2017. DOI: 10.1096/fj.201600859R

MAZIER, W. et al. A New Strain of *Christensenella minuta* as a Potential Biotherapy for Obesity and Associated Metabolic Diseases. **Cell**, v. 10, n. 4, p. 1–17, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10040823>

MILANI, C. et al. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 81, n. 4, p. 1–67, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-17>

MILLION, M. et al. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 6, p. 817–825, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1038/ijo.2011.153>

MINAMI, J. et al. Oral administration of *Bifidobacterium breve* B-3 modifies metabolic functions in adults with obese tendencies in a randomised controlled trial. **Journal of Nutrition Science**, v. 4, n. e17, p. 1–7, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1017/jns.2015.5>

MONTSERRAT-DE LA PAZ, S. Nutritional modulation of leptin expression and leptin action in obesity and obesity-associated complications. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 89, p. 1–8, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnuthbio.2020.108561>

MORAES, A. C. F. et al. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética. **Arquivos Brasileiros Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 4, p. 317-27, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/0004-2730000002940>

MOURA E DIAS, M. et al. Diet-induced obesity in animal models: points to consider and influence on metabolic markers. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 13, n. 32, p. 1–14, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13098-021-00647-2>

MURATA, C. et al. Delivery mode-associated gut microbiota in the first 3 months of life in a country with high obesity rates: A descriptive study.

**Medicine**, v. 99, n. 40, p. 1–10, 2020. DOI:

<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000022442>

MUSSI, R. F. F.; PETRÓSKI, E. L. Predictive capacity of obesity indicators for metabolic syndrome in adult quilombolas (Inhabitants of black communities). **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 24, n. 7, p. 2471–2480, 2019.

DOI: <https://doi.org/10.1590/1413-81232018247.19032017>

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

10, p. 2277–2284, 2010. DOI: <https://doi.org/10.2337/dc10-0556>

NICOLUCCI, A. C. et al. Prebiotics reduce body fat and alter intestinal microbiota in children who are overweight or with obesity.

**Gastroenterology**, v. 153, n. 3, p. 711–722, 2017. DOI:

[10.1053/j.gastro.2017.05.055](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.05.055)

OTTMAN, N. et al. Action and function of *Akkermansia muciniphila* in microbiome ecology, health and disease. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 31, n. 6, p. 637-642, 2017. DOI:

[10.1016/j.bpg.2017.10.001](https://doi.org/10.1016/j.bpg.2017.10.001)

PAHLAVANI, M. et al. Regulation and Functions of the Renin-Angiotensin System in White and Brown Adipose Tissue. **Comprehensive Physiology**, v. 7, n. 4, p. 1137–1150, 2017. DOI: [10.1002/cphy.c160031](https://doi.org/10.1002/cphy.c160031).

PAMER, E. G. Fecal microbiota transplantation: Effectiveness, complexities, and lingering concerns. **Mucosal Immunology**, v. 7, n. 2, p.

210–214, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/mi.2013.117>

PARK, D. Y. et al. Supplementation of *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032 in diet-induced obese mice is associated with gut microbial changes and reduction in obesity. **PLOS ONE**, v. 8, p. 1–

12, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059470>

PARK, J. E.; OH, S. H.; CHA, Y. S. *Lactobacillus brevis* OPK-3 from kimchi prevents obesity and modulates the expression of adipogenic and pro-inflammatory genes in adipose tissue of diet-induced obese mice.

**Nutrients**, v. 12, n. 3, p. 1–15, 2020. DOI:

<https://doi.org/10.3390/nu12030604>

PARLEE, S. D. et al. Quantifying size and number of adipocytes in adipose tissue. **Methods in Enzymology**, v. 537, p. 93–122, 2014. DOI:

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411619-1.00006-9>

PEREIRA, D. I.; MCCARTNEY, A. L.; GIBSON, G. R. An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4743–4752, 2003. DOI: 10.1128/AEM.69.8.4743-4752.2003

PÉREZ-MATUTE, P. et al. Autologous fecal transplantation from a lean state potentiates caloric restriction effects on body weight and adiposity in obese mice. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1–14, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64961-x>

PRYDE, S. E. et al. The microbiology of butyrate formation in the human colon. **FEMS Microbiology Letters**, v. 217, n. 2, p. 133–139, 2002. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11467.x

QADIR, R. M.; ASSAFI, M. S. The association between body mass index and the oral *Firmicutes* and *Bacteroidetes* profiles of healthy individuals. **Malays Fam Physician**, v. 16, n. 3, p. 36–43, 2021. DOI: <https://doi.org/10.51866/oa1129>

RAKOTOARIVELO, V. et al. Inflammatory cytokine profiles in visceral and subcutaneous adipose tissues of obese patients undergoing bariatric surgery reveal lack of correlation with obesity or diabetes. **eBioMedicine**, v. 30, p. 237–247, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.03.004>

RAMIREZ, A. V. G. A importância da microbiota no organismo humano e sua relação com a obesidade. **International Journal of Nutrology**, v.10, n. 4, p. 153–160, 2017. DOI: 10.1055/s-0040-1705647

REDONDO-USEROS, N. et al. Microbiota and lifestyle: a special focus on diet. **Nutrients**, v. 12, n. 6, p. 1–47, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12061776>

REIKVAM, D. H. et al. Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. **PLoS One**, v. 6, n. 3, 2011; p. 1–13, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017996>

REMELY, M. et al. Gut microbiota of obese, type 2 diabetic individuals is enriched in *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila* and *Peptostreptococcus anaerobius* after weight loss. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, v. 16, n. 2, p. 99–106, 2016. DOI: 10.2174/1871530316666160831093813

RIZZATTI, G.; IANIRO, G.; GASBARRINI, A. Antibiotic and modulation of microbiota: a new paradigm?. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 52, p. 74–77, 2018. DOI: 10.1097/MCG.0000000000001069

RIZZATTI, G. et al. *Proteobacteria*: A Common Factor in Human Diseases. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–7, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/9351507>

ROHLKE, F.; SURAWICZ, C. M.; STOLLMAN, N. Fecal flora reconstitution for recurrent *clostridium difficile* infection: results and methodology. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 44, n. 8, p. 567–570, 2010. DOI: [10.1097/MCG.0b013e3181dad10](https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e3181dad10)

ROY, C. C. et al. Short-chain fatty acids: ready for prime time? **Nutrition in Clinical Practice**, v. 21, n. 4, p. 351–366, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1177/0115426506021004351>

RUAN, W. et al. Healthy human gastrointestinal microbiome: composition and function after a decade of exploration. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 65, n. 3, p. 695–705, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06118-4>

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 43, p. 16767–16772, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0808567105>

SCHEIMAN, J. Promoting peak performance: Identifying and isolating novel probiotics from athlete microbiomes. **Proceedings of Probiota America**, Miami, USA, 2018. Disponível em: <<https://www.probiotaamericas.com/wp-content/uploads/2018/06/Probiota-Americas-2018-ONSITE-PROGRAM.pdf>>

SCHOELER, M.; CAESAR, R. Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 20, n. 4, p. 461–472, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09512-0>

SERGEEV, I. N. et al. Effects of synbiotic supplement on human gut microbiota, body composition and weight loss in obesity. **Nutrients**, v. 12, n. 1, p. 1–18, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12010222>

SHANAHAN, F.; GHOSH, T. S.; O'TOOLE, P. W. The Healthy Microbiome-What Is the Definition of a Healthy Gut Microbiome? **Gastroenterology**, v. 160, n. 2, p. 483–494, 2021. DOI: [10.1053/j.gastro.2020.09.057](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.09.057)

SHAPIRO, H. et al. Adipose tissue foam cells are present in human obesity. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 98, n. 3, p. 1173–1181, 2013. DOI: [10.1210/jc.2012-2745](https://doi.org/10.1210/jc.2012-2745)

SHEN, T. C. et al. Engineering the gut microbiota to treat hyperammonemia. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 7, p. 2841–2850, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI79214>

SILVA, E. V. **Otimização da seleção de cepas potencialmente probióticas para terapia personalizada.** Orientador: Daniela Cardoso Umbelino Cavallini. 2020. 93f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Alimentos e Nutrição: Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2020.

SILVA, T. F. et al. The impact of probiotics, prebiotics, and synbiotics on the biochemical, clinical, and immunological markers, as well as on the gut microbiota of obese hosts. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 2, p. 337-355, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1733483>

SILVEIRA, E. A.; VIEIRA, L. L.; SOUZA, J. D. High prevalence of abdominal obesity among the elderly and its association with diabetes, hypertension and respiratory diseases. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, n. 3, p. 903–912, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1413-81232018233.01612016>

SOLDI, S. et al. Modulation of the gut microbiota composition by rifaximin in non-constipated irritable bowel syndrome patients: a molecular approach. **Clinical and Experimental Gastroenterology**, v. 8, p. 309–325, 2015. DOI: <https://doi.org/10.2147/CEG.S89999>

SOUZA, S. A. et al. Adult obesity in different countries: an analysis via beta regression models. **Reports in Public Health**, v. 34, n. 8, p. 1–13, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/0102-311X00161417>

STALEY, C. et al. Stable engraftment of human microbiota into mice with a single oral gavage following antibiotic conditioning. **Microbiome**, v. 5, n. 87, p. 1–13, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0306-2>

STEIN, C. J.; COLDITZ, G. A. The epidemic of obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2522–2525, 2004. DOI: 10.1210/jc.2004-0288

SUEZ, J. et al. Post-antibiotic gut mucosal microbiome reconstitution is impaired by probiotics and improved by autologous FMT. **Cell**, v. 174, n. 6, p. 1406-1423, 2018. DOI: 10.1016/j.cell.2018.08.047

SWEENEY, T. E.; MORTON, J. M. The human gut microbiome: a review of the effect of obesity and surgically induced weight loss. **JAMA Surgery**, v.148, n. 6, p. 563-9, 2013. DOI: 10.1001/jamasurg.2013.5

TAN, G. S. E. et al. Gut microbiota modulation: implications for infection control and antimicrobial stewardship. **Advances in Therapy**, p. 1–14, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12325-020-01458-z>

TAPPENDEN, K. A. Ingestão: digestão, absorção, transporte e excreção de nutrientes. In: MAHAN, L. K.; RAYMOND, J. L. **Krause alimentos, nutrição e dietoterapia**. 14. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018. p. 64–109.

THIENNIMITR, P. et al. *Lactobacillus paracasei* HII01, xylooligosaccharides, and synbiotics reduce gut disturbance in obese rats. **Nutrition**, v. 54, p. 40-47, 2018. DOI: 10.1016/j.nut.2018.03.005

THURSBY, E.; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 11, p. 1823–1836, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>

TIFFANY, C. R.; BÄUMLER, A. J. Dysbiosis: from fiction to function. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 317, n. 5, p. 602–G608, 2019. DOI: 10.1152/ajpgi.00230.2019

TIRELLE, P. et al. Comparison of different modes of antibiotic delivery on gut microbiota depletion efficiency and body composition in mouse. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 340, p. 1–10, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02018-9>

TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **British Journal of Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 347-355, 2004. DOI: 10.1079/bjn20041213

VAISMAN, B. L. et al. Endothelial expression of human ABCA1 in mice increases plasma HDL cholesterol and reduces diet-induced atherosclerosis. **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 1, p. 158–167, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1194/jlr.M018713>

VAN DER HEIJDEN, R. A. et al. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. **Aging (Albany NY)**, v. 7, n. 4, p. 256–68, 2015. DOI: 10.18632/AGING.100738

VAN DER LELIE, D. et al. Rationally designed bacterial consortia to treat chronic immune-mediated colitis and restore intestinal homeostasis. **Nature Communications**, v. 12, n. 3105, p. 1–17, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23460-x>

VIRANI, S. S. Non-HDL cholesterol as a metric of good quality of care: opportunities and challenges. **Texas Heart Institute Journal**, v. 38, n. 2, p. 160-2, 2011.

VOHRA, R. S. et al. Atherosclerosis and the Lectin-like OXidized Low-Density Lipoprotein Scavenger Receptor. **Trends in Cardiovascular**

**Medicine**, v. 16, n. 2, p. 60–64, 2006. DOI:  
<https://doi.org/10.1016/j.tcm.2005.12.001>

VRIEZE, A. et al. Fecal transplant: A safe and sustainable clinical therapy for restoring intestinal microbial balance in human disease? **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 27, n. 1, p. 127–137, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2013.03.003>

WANG, Z.; NAKAYAMA, T. Inflammation, a link between obesity and cardiovascular disease. **Mediators of inflammation**, v. 2010, p. 1–17, 2010. DOI: 10.1155/2010/535918

WALL, R. et al. Metabolic activity of the enteric microbiota influences the fatty acid composition of murine and porcine liver and adipose tissues. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 5, p. 1393–1401, 2009. DOI: <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27023>

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003. DOI: 10.1172/JCI19246

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. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 57, n. 5, p. 339–345, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302013000500002>

WILLING, B. P.; RUSSELL, S. L.; FINLAY, B. B. Shifting the balance: antibiotic effects on host–microbiota mutualism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 233–43, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2536>

WINZELL, M. S.; AHRÉN, B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 53, p. 215–219, 2004. DOI: [https://doi.org/10.2337/diabetes.53.suppl\\_3.S215](https://doi.org/10.2337/diabetes.53.suppl_3.S215)

World Health Organization (WHO) (2021). Obesity and overweight. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>

XIAO, J. et al. Organ transplantation and gut microbiota: Current reviews and future challenges. **American Journal of Translational Research**, v. 10, n. 11, p. 3330–3344, 2018.

XU, D. et al. Rifaximin alters intestinal bacteria and prevents stress-induced gut inflammation and visceral hyperalgesia in rats. **Gastroenterology**, v. 146, n. 2, p. 484–496, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.10.026>

XU, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 12, p. 1821–1830, 2003. 112. DOI: 10.1172/JCI19451

XU, M. Q. et al. Fecal microbiota transplantation broadening its application beyond intestinal disorders. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 1, p. 102–11, 2015. DOI: 10.3748/wjg.v21.i1.102

YANG, F. et al. Characterization of metabolites and biomarkers for the probiotic effects of *Clostridium cochlearium* on high-fat diet-induced obese C57BL/6 mice. **European Journal of Nutrition**, v. 61, p. 2217-2229, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00394-022-02840-z>

ZHANG, C. X.; WANG, H. Y.; CHEN, T. X. Interactions between Intestinal Microflora/Probiotics and the Immune System. **BioMed Research International**, p. 1–8, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/6764919>

ZHANG, T. et al. Washed microbiota transplantation vs. manual fecal microbiota transplantation: clinical findings, animal studies and in vitro screening. **Protein & Cell**, v. 11, n. 4, p. 251–266, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13238-019-00684-8>

ZMORA, N. et al. Taking it personally: personalized utilization of the human microbiome in health and disease. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 1, p. 12–20, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.12.016>

## Anexos

### Anexo 1. Protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCF – UNESP, Araraquara.



#### PARECER DO RELATOR (Provisório)

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** "Terapia probiótica personalizada na redução do risco de doenças relacionadas à disbiose"

**Pesquisador:** Eliane Vale da Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 50423421.0.0000.5426

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.076.109

**Data prevista para a reunião do Colegiado:** 20/10/2021

##### Apresentação do Projeto:

idem parecer anterior

##### Objetivo da Pesquisa:

idem parecer anterior

##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

idem parecer anterior

##### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

idem parecer anterior

##### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O termo de consentimento foi alterado para a assinatura do responsável.

O termo de assentimento foi anexado e possui ilustrações de forma lúdica.

##### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovado

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento                 | Arquivo                                           | Postagem               | Autor | Situação |
|--------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------|-------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P<br>ROJETO_1785581.pdf | 19/09/2021<br>19:23:30 |       | Aceito   |

**Endereço:** Rodovia Araraquara Jaú, km 1

**Bairro:** Campus Universitário

**CEP:** 14.801-902

**UF:** SP

**Município:** ARARAQUARA

**Telefone:** (18)3301-4857

**E-mail:** sta@fcfar.unesp.br

|                                                                                                                                                                                                                     |                                                                          |                                                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
|  <b>Comitê de<br/>Ética em<br/>Pesquisa</b><br><small>Faculdade de Ciências Farmacêuticas<br/>Campus de Araraquara - UNESP</small> | <b>UNESP - FACULDADES DE<br/>CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS<br/>DO CAMPUS DE</b> |  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|

Continuação do Parecer: 5.076.109

|                                                                       |                                            |                        |                      |        |
|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------|----------------------|--------|
| Outros                                                                | CR.pdf                                     | 19/09/2021<br>19:22:52 | Eliane Vale da Silva | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência             | TCLE.doc                                   | 19/09/2021<br>19:17:04 | Eliane Vale da Silva | Aceito |
| Folha de Rosto                                                        | Folharosto.pdf                             | 19/09/2021<br>19:15:41 | Eliane Vale da Silva | Aceito |
| Parecer Anterior                                                      | PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_4979329.pdf | 19/09/2021<br>19:13:42 | Eliane Vale da Silva | Aceito |
| Outros                                                                | TA.doc                                     | 19/09/2021<br>19:11:00 | Eliane Vale da Silva | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                             | ProjetoObesidade.pdf                       | 23/07/2021<br>17:16:47 | Eliane Vale da Silva | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                             | ProjetoColite.pdf                          | 23/07/2021<br>17:16:38 | Eliane Vale da Silva | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                             | projeto inicial.pdf                        | 23/07/2021<br>17:16:26 | Eliane Vale da Silva | Aceito |
| Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco | termo_doacao.doc                           | 23/07/2021<br>17:06:40 | Eliane Vale da Silva | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

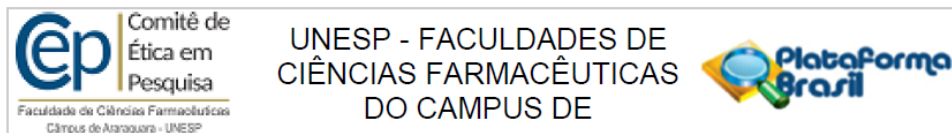
ARARAQUARA, 03 de Novembro de 2021

Assinado por:



Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, km 1  
 Bairro: Campus Universitário CEP: 14.801-902  
 UF: SP Município: ARARAQUARA  
 Telefone: (16)3301-4657 E-mail: sta@fcr.unesp.br

## Anexo 2. Protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCF – UNESP, Araraquara.



### PARECER DO RELATOR (Provisório)

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Otimização da seleção de cepas potencialmente probióticas para terapia personalizada

**Pesquisador:** Eliane Vale da Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 14569519.4.0000.5426

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.374.343

**Data prevista para a reunião do Colegiado:** 27/06/2019

#### Apresentação do Projeto:

O objetivo do estudo é otimizar a seleção de cepas potencialmente probióticas (principalmente *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp.) e construir um “banco de células individualizado” para serem utilizadas em terapia personalizada de doenças relacionadas à disbiose. As cepas serão selecionadas de material fecal de 5 crianças com idades entre dois e seis anos de idade. Posteriormente será realizada a caracterização (RAPD PCR, coloração de Gram, teste de resistência gastrointestinal e suscetibilidade a antibióticos) das cepas selecionadas e as mesmas serão armazenadas à -80°C. A composição da microbiota fecal de cada criança será determinada por sequenciamento (Illumina Miseq) e os dados serão analisados e agrupados segundo a taxonomia e a diversidade intra e entre amostras, utilizando a base de dados Greengenes.

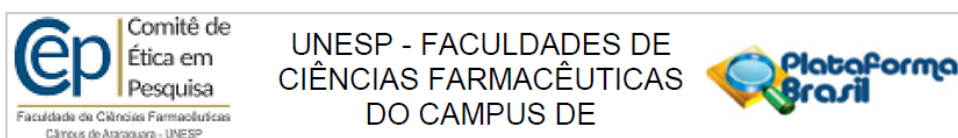
#### Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do estudo é otimizar a seleção de cepas potencialmente probióticas (principalmente *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp.) e construir um “banco de células individualizado” para serem utilizadas em terapia personalizada de doenças relacionadas à disbiose.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos, podendo levar apenas a algum constrangimento e desconforto no

**Endereço:** Rodovia Araraquara Jaú, km 1  
**Bairro:** Campus Universitário **CEP:** 14.801-902  
**UF:** SP **Município:** ARARAQUARA  
**Telefone:** (16)3301-4657 **E-mail:** sta@fctar.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.374.343

momento da coleta das fezes.

Com relação aos benefícios os pesquisadores relatam que com o estudo poderá ser ampliado o conhecimento sobre a microbiota infantil, além de propiciar a construção de um "banco de células individualizado" para ser utilizado em terapia personalizada de doenças relacionadas à disbiose.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto está bem estruturado e a proposta bem apresentada.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O TCLE está adequadamente apresentado e é solicitada dispensa do Termo de Assentimento com a justificativa de que as crianças participantes (2 a 6 anos) não possuem autonomia e maturidade suficientes para compreensão do estudo e para assentir sua participação.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto encontra-se adequado para aprovação do CEP.

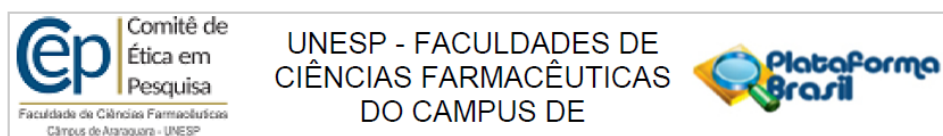
**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento                                                        | Arquivo                                       | Postagem               | Autor                | Situação |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------|----------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto                                        | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1322921.pdf | 27/05/2019<br>13:52:09 |                      | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência             | TCLE_.doc                                     | 27/05/2019<br>13:51:32 | Eliane Vale da Silva | Aceito   |
| Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco | termo_doacao_materialbiologico.doc            | 27/05/2019<br>13:47:56 | Eliane Vale da Silva | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                             | projeto.pdf                                   | 24/05/2019<br>12:01:30 | Eliane Vale da Silva | Aceito   |
| Outros                                                                | dispensa.pdf                                  | 24/05/2019<br>12:01:00 | Eliane Vale da Silva | Aceito   |
| Folha de Rosto                                                        | BRN3C2AF43EE185_001450.pdf                    | 15/04/2019<br>10:58:13 | Eliane Vale da Silva | Aceito   |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Endereço:** Rodovia Araraquara Jaú, km 1  
**Bairro:** Campus Universitário **CEP:** 14.801-902  
**UF:** SP **Município:** ARARAQUARA  
**Telefone:** (16)3301-4657 **E-mail:** sta@fcfar.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.374.343

ARARAQUARA, 06 de Junho de 2019



**Endereço:** Rodovia Araraquara Jaú, km 1  
**Bairro:** Campus Universitário **CEP:** 14.801-902  
**UF:** SP **Município:** ARARAQUARA  
**Telefone:** (16)3301-4657 **E-mail:** sta@fcfar.unesp.br

**Anexo 3.** Protocolo de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCF – UNESP, Araraquara.



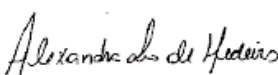
**CERTIFICADO**

\*Torna sem efeito o Parecer CEUA 13/2021, de 10/02/2021

Certificamos que a proposta intitulada “**Terapia personalizada para o tratamento da obesidade**”, registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAr: 27/2020, sob a responsabilidade da pesquisadora Jaqueline Cristina Galiardo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e teve suas alterações aprovadas pela Coordenadora da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em reunião realizada no dia 30 de junho de 2021.

|                         |                                                                  |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Finalidade              | ( ) Ensino (X) Pesquisa Científica                               |
| Vigência da autorização | Julho de 2022                                                    |
| Espécie/linhagem/raça   | Camundongo heterogênico Swiss                                    |
| Nº de animais           | 60                                                               |
| Peso/Idade              | 30g - 06 semanas                                                 |
| Sexo                    | Machos                                                           |
| Origem                  | Biotério Central da Unicamp – CEMIB ou Biotério Central da UNESP |
| Registro CIAEP          | 02.00082.2019                                                    |

Araraquara, 02 de julho de 2021.

  
 Profa Dra Alexandra Ivo de Medeiros  
 Coordenadora da CEUA