



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Ariela Maína Boeder

**A RELAÇÃO DA MICROBIOTA COM A PRESSÃO ARTERIAL E PARÂMETROS  
COMPORTAMENTAIS DE DUAS LINHAGENS ISOGÊNICAS DE RATOS**

Florianópolis

2019

Ariela Maína Boeder

**A RELAÇÃO DA MICROBIOTA COM A PRESSÃO ARTERIAL E PARÂMETROS  
COMPORTAMENTAIS DE DUAS LINHAGENS ISOGÊNICAS DE RATOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

**Orientador:** Prof. Geison Souza Izídio, Dr.

**Coorientador:** Prof. Fernando Spiller, Dr.

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Boeder, Ariela Maína

A relação da microbiota com a pressão arterial e parâmetros comportamentais de duas linhagens isogênicas de ratos / Ariela Maína Boeder ; orientador, Geison Souza Izídio, coorientador, Fernando Spiller, 2019.

73 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Relação da microbiota com a pressão arterial. 3. Relação da microbiota com parâmetros comportamentais. I. Izídio, Geison Souza. II. Spiller, Fernando . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Ariela Maína Boeder

**A relação da microbiota com a pressão arterial e parâmetros comportamentais  
de duas linhagens isogênicas de ratos**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca  
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Fernanda Barbosa Lima, Dr.(a)  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Renata Maria Lataro, Dr.(a)  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi  
julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmacologia.

---

Prof. Rui Daniel S. Prediger, Dr.  
Coordenador do Programa

---

Prof. Geison Souza Izídio, Dr.  
Orientador

Florianópolis, 2019

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Geison de Souza Izídio por ter me acolhido no Laboratório de Genética do Comportamento. Por ter me guiado durante esse período e me proporcionado a oportunidade de desenvolver meu senso crítico e científico. Muito obrigada por toda a amizade dentro e fora do laboratório.

Ao Prof. Dr. Fernando Spiller, meu coorientador, por contribuir ao desenho experimental e discussão de resultados, assim como ceder recursos e sua estrutura laboratorial.

À Profa. Dra. Aurea Elizabeth Linder e mestranda Carol Moreira pelo suporte técnico e por disponibilizarem sua estrutura laboratorial.

À Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro De Lima por disponibilizar o espaço físico do laboratório.

À Luciana Honorato por todo auxílio durante a parte experimental e por toda atenção e carinho.

Ao Hospital e Maternidade Dr. Carlos Corrêa, Hospital Nereu Ramos e Secretaria de Estado da Saúde por disponibilizarem recursos essenciais para o desenvolvimento desse trabalho.

À minha família, em especial a minha mãe Marli Stüpp Boeder, meu exemplo de mulher guerreira, a qual muitas vezes se sacrificou em benefício dos filhos. Obrigada por todo o amor, carinho e por sempre apoiar as minhas escolhas.

Aos alunos e ex-alunos do Laboratório de Genética do Comportamento (LGC) com quem convivi durante esses dois anos. Em especial a doutoranda Julia, que se tornou uma grande amiga desde que nos conhecemos. Obrigada por me entender e sempre estar por perto. À doutoranda Natalli que sempre está presente seja com alguma frase de sabedoria ou com momentos de descontração. À Pós doutoranda Aline, por todas as conversas, conselhos e carinho. À aluna de iniciação científica, Luanna, que me acompanhou durante alguns experimentos e se tornou uma amiga dentro e fora do laboratório. Aos meninos, Santhiago, José, Breno e Rafael por todos os momentos compartilhados durante essa fase. Muito obrigada a todos por tornarem os dias mais leves.

Às minhas amigas Priscila, Adrielli, Ana e Bruna pela paciência, companheirismo e amizade.

Ao meu namorado, Lucas que não mediu esforços para me ajudar em todos os momentos de dificuldade. Obrigada por todo amor, atenção e paciência em todos os momentos bons e ruins dessa fase.

Aos amigos que a farmacologia me deu e que estiveram presentes em todos os bares, conversas e desabafos. Obrigada pela força nos momentos de desespero.

Aos Profs. Drs. Fernanda Barbosa Lima, Renata Maria Lataro, Carlos Rodrigo Zarate Blades e Jamil Assereuy Filho, pela participação na banca examinadora desta dissertação e pelas valiosas contribuições.

À CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

À todos que não estão aqui explicitados, mas que colaboraram de alguma forma para a execução deste trabalho.

## RESUMO

O uso de modelos animais como os ratos SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*) nas pesquisas que relacionam microbiota e o sistema cardiovascular demonstram-se promissores. Ratos da linhagem SLA16 (SHR.LEW-*Anxrr16*) possuem o perfil genético idêntico ao da linhagem SHR, com exceção de uma região genômica diferencial localizada no cromossomo 4. Até o momento, as diferenças comportamentais e fisiológicas apresentadas entre essas duas linhagens são associadas às suas diferenças genômicas, mas se faz necessário a busca de respostas sobre a interferência dos seus microbiomas. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo investigar a microbiota e a sua participação nas alterações comportamentais e fisiológicas entre as linhagens SHR e SLA16. Para o estudo foram utilizadas ratas fêmeas de 4-5 meses. No primeiro bloco experimental foi realizada avaliação do ciclo estral de fêmeas com posterior análise de pressão arterial sistólica (PAS) e comportamento no Campo Aberto (CA). No segundo e terceiro blocos experimentais foram realizados tratamentos com um coquetel de antibióticos de amplo espectro por gavagem (12/12h; durante 13 dias) seguido de transplante da microbiota fecal (TMF). Posteriormente, foram realizadas (i) análises de PAS antes, durante e após o tratamento com os antibióticos, e durante o TMF; além de (ii) análises comportamentais no CA, Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e Caixa Atividade (CA<sub>ativ</sub>) após antibioticoterapia e TMF. Em suma, no primeiro bloco experimental, não houve diferenças de PAS e comportamento no CA entre as fases do ciclo estral de ratas SHR e SLA16. No segundo bloco experimental, as análises de microbiota, após a administração de antibiótico, resultaram em diminuição da PAS de ratas SHR. Ocorreram também efeitos comportamentais, resultando em diminuição da locomoção no CA e CA<sub>ativ</sub>, assim como, uma diminuição do comportamento tipo-ansioso no LCE de ambas as linhagens. Por fim, no terceiro bloco experimental, as análises realizadas durante o TMF demonstraram aumento da PAS em ratas SLA16 sem efeitos significativos em relação aos comportamentos. Dessa forma, o compilado de resultados demonstra que a microbiota intestinal tem relação com a PAS e o comportamento, pois a sua depleção modificou essas variáveis em ambas as linhagens. O efeito de aumento da PAS específico de linhagem, durante o TMF, sugere que exista uma interação entre genótipo e microbioma, que deve ser investigada futuramente.

**Palavras-chave:** Microbioma. Hipertensão. SHR. SLA16.

## ABSTRACT

The use of animal models such as SHR (Spontaneously Hypertensive Rats) in researches that correlates microbiota and the cardiovascular system are promising. SLA16 (SHR.LEW-Anxrr16) rats have the same genetic profile as the SHR strain, except for a differential genomic region mapped on chromosome 4. To date, the behavioral and physiological differences between these two strains are associated with genomic differences, but it is necessary to search for answers about the interference of their microbiomes. Thus, this study aims to investigate the microbiota and its participation in behavioral and physiological changes between the SHR and SLA16 strains. 4-month-old SHR and SLA16 female rats were used for the study. In the first experimental set, the estrous cycle of females was evaluated with subsequent analysis of systolic blood pressure (SBP) and open-field behavior (OF). In the second and third experimental sets, treatment was performed with a cocktail of broad-spectrum antibiotics by gavage (12/12h; for 13 days) followed by fecal microbiota transplantation (FMT). Subsequently, (i) SBP analyses were performed before, during and after antibiotic treatment, and during the FMT; and (ii) behavioral analyzes in OF, elevated plus maze (EPM) and activity cage (AC) after antibiotic therapy and FMT. In the first experimental set, there are no differences in SBP and OF behavior during the different phases of the estrous cycle of SHR and SLA16 rats. In the second experimental set, microbiota analyzes after antibiotic administration resulted in decreased SBP in SHR rats. Behavioral effects also occurred, resulting in decreased locomotion in OF and AC, as well as a decrease in anxiety-related behavior in both strains. Finally, in the third experimental set, the analyzes performed during the FMT between strains showed an increase in SBP in SLA16 rats without significant effects on behaviors. Thus, the compiled results show that the intestinal microbiota is related to SBP and behavior, since its depletion changed these variables in both strains. The strain-specific increase in SBP during FMT suggests that there is an interaction between genotype and microbiome that should be further investigated.

**Keywords:** Microbiome. Hypertension. SHR. SLA16.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação genômica entre as linhagens LEW, SHR e SLA16..	20
Figura 2. Hipótese do presente trabalho.....	22
Figura 3. Delineamento experimental da avaliação do ciclo estral e sua influência na pressão arterial e comportamento das linhagens SHR e SLA16.....	29
Figura 4. Delineamento experimental do tratamento com antibióticos.....	31
Figura 5. Delineamento experimental do tratamento com transplante da microbiota fecal. ....	32
Figura 6. Análise do ciclo estral de ratas SHR e SLA16. ....	34
Figura 7. Pressão arterial sistólica em ratos SHR e SLA16 nas fases do ciclo estral. ....	35
Figura 8. Campo aberto nos ratos SHR e SLA16 nas fases do ciclo estral. ....	36
Figura 9. Pressão arterial sistólica (PAS) nos ratos SHR e SLA16 tratados com coquetel de antibiótico e salina. ....	37
Figura 10. Campo aberto nos ratos SHR e SLA16 tratados com coquetel de antibiótico ou salina.....	39
Figura 11. Labirinto em cruz elevado nos ratos SHR e SLA16 tratados com coquetel de antibiótico ou salina.....	40
Figura 12. Caixa atividade nos ratos SHR e SLA16 tratados com coquetel de antibiótico ou salina.....	41
Figura 13. Cultivo bacteriano das fezes de ratos SHR e SLA16 tratados com coquetel de antibiótico ou salina.....	42
Figura 14. Bactérias e fungo isolados e identificados após antibioticoterapia. ....	43
Figura 15. Acompanhamento da massa corporal de ratos submetidos ao protocolo do segundo bloco experimental .....	44
Figura 16. Cultivo bacteriano das fezes de ratos SHR e SLA16 tratados com TMF ou salina.....	45
Figura 17. Campo aberto nos ratos SHR e SLA16 tratados com TMF ou salina .....	46
Figura 18. Labirinto em cruz elevado nos ratos SHR e SLA16 tratados com TMF ou salina. ....	47
Figura 19. Pressão arterial sistólica (PAS) nos ratos SHR e SLA16 tratados com antibiótico seguido de TMF ou salina. ....	48
Figura 20. Acompanhamento da massa corporal de ratos submetidos ao protocolo do terceiro bloco experimental .....	49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Antibióticos utilizados ao longo do tratamento. ....	30
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCCs Ácidos graxos de cadeia curta  
AMPc Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico  
Anxrr16 resposta relacionada à ansiedade 16  
ANOVA análise de variância  
ATP Adenosina trifosfato  
BHI *Brain Heart Infusion*  
CA teste do campo aberto  
CA<sub>ativ</sub> caixa de atividade  
CEEs Células enteroendócrinas  
CECs Células enterocromafins  
EPM Erro padrão da média  
ERO Espécies reativas de oxigênio  
GI Gastrointestinal  
GN Gram negativo  
GP Gram positivo  
Gpr41 Receptor acoplado a proteína G 41  
Gpr43 Receptor acoplado a proteína G 43  
IL-6 Interleucina 6  
IL-17 Interleucina 17  
INPM Instituto nacional de pesos e medidas  
LEW linhagem de ratos Lewis  
LCE labirinto em cruz elevado  
LPS Lipopolissacarídeo  
NaCl Cloreto de sódio  
Olfr78 Receptor olfatório 78  
PAS Pressão arterial sistólica  
RGD região genômica diferencial  
SF Solução fecal  
SHR ratos espontaneamente hipertensos (*Spontaneously Hypertensive Rats*)  
SLA16 SHR.LEW-Anxrr16  
SNA Sistema nervoso autônomo  
SNC sistema nervoso central

SPF Livre de patógenos específicos (*Specific Pathogen Free*)

TDAH Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

TGF- $\beta$  Fator de transformação do crescimento beta

Th17 Célula T helper 17

TMF Transplante da microbiota fecal

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1. MICROBIOTA.....	15
1.2. MICROBIOTA E HIPERTENSÃO.....	16
1.3. O EIXO CÉREBRO-INTESTINO-MICROBIOTA .....	17
1.4. LINHAGENS ISOGÊNICAS SHR E SLA16.....	19
1.5. JUSTIFICATIVA .....	21
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	23
2.1. OBJETIVO GERAL.....	23
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
3.1. ANIMAIS.....	24
3.2. BEM-ESTAR ANIMAL .....	24
3.3. AVALIAÇÃO DO CICLO ESTRAL.....	24
3.4. MEDIÇÃO NÃO INVASIVA DA PRESSÃO ARTERIAL.....	25
3.5. CULTIVO BACTERIANO DAS FEZES.....	26
3.6. IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS BACTERIANAS .....	26
3.7. TESTES COMPORTAMENTAIS.....	27
<b>3.7.1. Campo aberto</b> .....	27
<b>3.7.2. Labirinto em Cruz elevado</b> .....	27
<b>3.7.3. Caixa de atividade</b> .....	28
<b>4. Delineamento Experimental</b> .....	29
4.1. PRIMEIRO BLOCO EXPERIMENTAL.....	29
4.2. SEGUNDO BLOCO EXPERIMENTAL .....	30
<b>4.2.1. Administração de antibiótico</b> .....	30
4.3. TERCEIRO BLOCO EXPERIMENTAL.....	31
<b>4.3.1. Preparo e transplante da microbiota fecal</b> .....	31
<b>5. RESULTADOS</b> .....	33
4.1. PRIMEIRO BLOCO EXPERIMENTAL.....	33
<b>4.1.1. Avaliação do ciclo estral</b> .....	33
<b>4.1.2. Pressão arterial</b> .....	34
<b>4.1.3. Campo aberto</b> .....	35

4.2. SEGUNDO BLOCO EXPERIMENTAL .....	36
4.2.1. Pressão arterial.....	37
4.2.2. Campo aberto.....	38
4.2.3. Labirinto em cruz elevado.....	40
4.2.4. Caixa atividade.....	41
4.2.5. Cultivo bacteriano.....	41
4.2.5. Identificação de cepas bacterianas.....	42
4.3.5. Massa corporal.....	43
4.3. TERCEIRO BLOCO EXPERIMENTAL.....	44
4.3.1. Cultivo bacteriano.....	45
4.3.2. Campo aberto.....	45
4.3.3. Labirinto em cruz elevado.....	47
4.3.4. Pressão arterial sistólica.....	47
4.3.5. Massa corporal.....	48
6. DISCUSSÃO .....	50
6.1. PRIMEIRO BLOCO EXPERIMENTAL.....	50
6.2. SEGUNDO BLOCO EXPERIMENTAL .....	53
6.3. TERCEIRO BLOCO EXPERIMENTAL.....	60
7. CONCLUSÕES .....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. MICROBIOTA

Como indivíduos, servimos como hospedeiros de trilhões de microrganismos, os quais incluem bactérias, fungos, protistas e vírus que denominamos de microbiota. As bactérias compõem uma parcela importante dessa microbiota e vêm sendo amplamente estudadas, sendo que a maior parte dessa população reside no intestino. Embora essas bactérias tenham sido historicamente atribuídas como auxiliares na digestão no trato gastrointestinal (GI), devido à multiplicidade de interações diretas e indiretas com o organismo, essa microbiota intestinal também está intimamente ligada à saúde do hospedeiro (SAVAGE, 2001).

Para entender efetivamente o papel da microbiota comensal na fisiologia do hospedeiro, tornou-se necessário descrever a composição complexa da microbiota. Assim, atualmente, ferramentas moleculares estão sendo utilizadas em estudos tanto com humanos como em outros animais, para determinar a forma como a microbiota em seres humanos é diferente e/ou semelhante à de roedores (LAY et al., 2005). Ou seja, foram desenvolvidas ferramentas moleculares e metagenômicas que permitiram entender melhor a estrutura e função da comunidade microbiana intestinal (LAY et al., 2005). Desta forma, vários filos bacterianos são representados no intestino, com considerável diversidade de espécies. Os dois filos mais proeminentes são Firmicutes e Bacteroidetes, seguido de Proteobactérias, Actinobacteria e Fusobactérias, em números reduzidos (QIN et al., 2010). Porém, a composição do ecossistema intestinal pode ser influenciada por múltiplos fatores, tais como idade, ambiente, hábitos alimentares e a aplicação de antibióticos.

O estudo da microbiota do trato GI envolve então, além da investigação dos microrganismos presentes (abundância e diversidade), a sua atividade (geralmente determinada *in vitro* e *in vivo*) e as interações sinérgicas e competitivas em um hospedeiro. Os métodos de estudos, que nos últimos anos vêm trazendo grandes avanços ao conhecimento sobre a microbiota, se fazem a partir do uso de modelos experimentais com roedores.

Dentre as técnicas essenciais para a pesquisa da microbiota intestinal, incluem-se a manipulação de animais isentos de microbiota, isto é, isento de quaisquer vírus, bactérias, fungos ou parasitas (*germ-free*) e animais *Specific Pathogen Free* (SPF)

que são caracterizados por constituírem uma microbiota mais livre de patógenos específicos. Outras abordagens contam com inoculação controlada de microrganismos específicos benéficos para o organismo (probióticos); intervenção dietética com substâncias fermentáveis; carboidratos; fibras que beneficiam crescimento e metabolismo de componentes da microbiota (prebióticos); além da administração de metabolitos gerados pela microbiota a partir da quebra de alimentos; e intervenções no ecossistema através de tratamento com antibióticos e transplantes da microbiota fecal (TMF) (CHEN et al., 2005; BÄCKHED et al., 2007).

Devido a essas novas abordagens, ao longo da última década vêm surgindo evidências crescentes sobre a relação da composição da microbiota intestinal sobre diversos sistemas, incluindo o sistema cardiovascular, imunológico, neural e endócrino. Nesses sistemas, já foram descritos mecanismos pelos quais a microbiota intestinal e seus metabólitos atuam em alvos celulares prevenindo ou contribuindo para a patogênese de diversas patologias (MARQUES et al., 2018).

## 1.2. MICROBIOTA E HIPERTENSÃO

A hipertensão é uma condição complexa e multifatorial influenciada por fatores genéticos e ambientais. Esses fatores incluem, entre outros, inatividade física, obesidade, consumo alto de álcool, uso de tabaco, níveis altos de estresse e má alimentação. Devido a essa doença ser intimamente influenciada por fatores do estilo de vida, essas observações fornecem uma nova perspectiva sobre a doença e sugerem que a microbiota intestinal e seus metabólitos podem ser tão importantes quanto os fatores genéticos (MARQUES et al., 2018). Um dos modelos genéticos mais utilizados para o estudo da hipertensão são os *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR), que desenvolvem hipertensão arterial a partir da quinta semana de vida. Essa linhagem isogênica de ratos (indivíduos que apresentam o mesmo genoma entre si) foi desenvolvida a partir do cruzamento de ratos Wistar selecionados com pressão arterial elevada (OKAMOTO e AOKI, 1963).

Embora numerosos estudos já busquem discutir o papel da disbiose (desequilíbrio entre bactérias comensais e patogênicas) no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não estão completamente elucidados. Estudos recentes utilizando modelos de hipertensão com administração de probióticos (GOMEZ-GUZMA'N et al., 2015),



prebióticos (TUNAPONG et al., 2017) antibióticos, transplante da microbiota fecal (ADNAN et al., 2017) e modelos isentos de colonização intestinal (animais *germ-free*) demonstram essa íntima relação do microbioma com o sistema cardiovascular. Por exemplo, estudos sugerem que animais SHR apresentam uma disbiose quando comparados aos Wistar-Kyoto (WKY) (YANG et al., 2015), sendo que essa surge na mesma fase de desenvolvimento do animal em que ocorre o aparecimento da hipertensão arterial (SANTISTEBAN et al., 2017). Além disso, a redução da microbiota intestinal de ratos SHR pelo tratamento com antibióticos interfere nos níveis pressóricos, causando uma diminuição da hipertensão desses animais (GALLA et al., 2018). Atualmente, essa disbiose intestinal é visível tanto em modelos animais (DURGAN et al., 2016) quanto em seres humanos hipertensos, resultando em proporções alteradas entre os filos Firmicutes e Bacteroidetes e culminando, assim, na diminuição da riqueza bacteriana intestinal (YANG et al., 2015; LI et al., 2017).

### 1.3. O EIXO CÉREBRO-INTESTINO-MICROBIOTA

Semelhante ao sistema cardiovascular, o sistema neural também possui uma relação íntima com a microbiota intestinal. Estudos utilizando estratégias e modelos animais *germ free* demonstram que diferentes tipos de estressores psicológicos modulam a composição e a biomassa total da microbiota entérica (MEDDINGS e SWAIN, 2000). Desta forma, o sistema nervoso autônomo (SNA) regula funções intestinais como motilidade, secreção de ácido gástrico, produção de muco, peptídeos intestinais e antimicrobianos e resposta imune da mucosa (MAYER et al., 2011). Nesse contexto, modelos experimentais que utilizam roedores, demonstram que a permeabilidade intestinal pode aumentar em resposta ao estresse, aos traumatismos, à pancreatite, e ao choque séptico, causando a translocação bacteriana do lúmen intersticial para a circulação (BRZOZOWSKI et al., 2016). Esse fenótipo ocorre junto com o aumento dos níveis de metabólitos bacterianos circulantes, como o LPS, que modulam diferentes efeitos em outros órgãos, induzindo assim vários sintomas fisiológicos e/ou comportamentais (RUDZKI e SZULC, 2018).

Essa sinalização bidirecional ocorre através do Eixo cérebro-intestino-microbiota que é composto por um conjunto de complexas vias envolvendo a via nervosa, neuroendócrina e imune que são vitais para manter a homeostase do organismo (LIANG et al., 2018).

Em relação à via nervosa, os sinais intestinais podem ser transmitidos para o cérebro através do nervo vago e do sistema nervoso simpático. Estudos indicam que a infecção por patógenos, como *Campylobacter jejuni* e *Citrobacter amalonaticus*, levam ao aumento do comportamento relacionado à ansiedade, enquanto que, suplementação probiótica com bactérias, como a *Lactobacillus rhamnosus* e a *Bifidobacterium longum*, reduzem a ansiedade e comportamentos depressivos (BERCIK et al., 2011). Sugere-se que tanto os efeitos ansiogênicos/depressivos quanto os ansiolíticos/antidepressivos dependem do nervo vago, pois esses efeitos podem ser eliminados através de vagotomia (FORSYTHE et al., 2014).

Além disso, também são descritas algumas espécies bacterianas envolvidas na estimulação da produção de outros neurotransmissores como dopamina (um dos principais neurotransmissores de recompensa); noradrenalina (conhecido por seu papel na excitação e vasoconstrição, além de estar envolvida no comportamento e cognição, como memória, aprendizado e atenção); serotonina (envolvida na regulação de numerosos processos fisiológicos, incluindo secreção gastrointestinal, vasoconstrição, comportamento e função neurológica); e o GABA (principal neurotransmissor inibitório do SNC) (STRANDWITZ, 2018; BORODOVITSYNA et al., 2017; BERGER et al., 2009; WONG et al., 2003). Desses neurotransmissores, o melhor exemplo que caracteriza essa interação entre a microbiota e o sistema nervoso central é a serotonina, pois esta tem 95% da sua produção e armazenamento realizados por células enterocromafins (CECs) do trato GI e apenas 5% é armazenado no SNC (KIM et al., 2000).

Como já citado, outro caminho importante pelo qual a microbiota intestinal e seus metabólitos se comunicam com o SNC, ocorre através das células do sistema endócrino no intestino. As células enteroendócrinas (CEEs) são intercaladas entre células epiteliais em todo o comprimento do intestino e contém mais de 20 diferentes tipos de moléculas de sinalização que podem atingir a circulação e o SNC. Através dessa via neuroendócrina, que inclui a participação do eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal, a microbiota intestinal afeta a concentração e a função de moléculas que incluem peptídeos intestinais, oxitocinas, peptídeos opióides e neuro-hormônios (LIANG et al., 2018; MARTIN et al., 2018).

Além da via endócrina, a microbiota pode causar alterações imunológicas que também afetam o SNC. Até o momento, já foram observadas contribuições substanciais da microbiota com a homeostase da micróglia (células fagocíticas que se

infiltram no cérebro durante o desenvolvimento do organismo e desempenham um papel vital na vigilância imunológica e na homeostase do SNC) (ERNY et al., 2015). Essas evidências foram demonstradas quando a ausência da microbiota intestinal acarreta uma deficiência imune significativa no SNC, devido aos defeitos na maturação, diferenciação e função destas células (GENSOLLEN et al., 2016). Além disso, estudos já correlacionam a presença de células e citocinas pró-inflamatórias na redução da integridade da barreira hematoencefálica, assim como na ativação da micróglia, desencadeando uma inflamação excessiva que está implicada no desenvolvimento de distúrbios depressivos e de patologias neurodegenerativas (WAISMAN et al., 2015).

#### 1.4. LINHAGENS ISOGÊNICAS SHR E SLA16

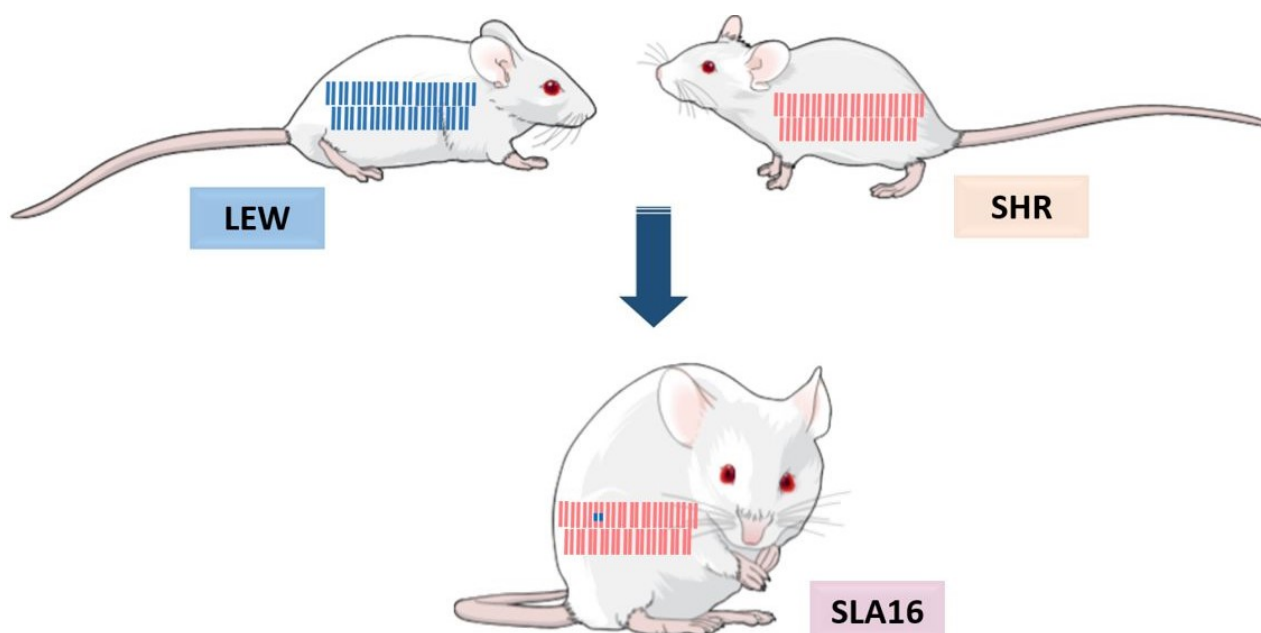
Como mencionado, a relação entre microbiota e a fisiologia animal está presente em diferentes estudos utilizando animais isogênicos, como, por exemplo, o SHR que apresenta uma disbiose ao ser comparado com animais WKY. Neste contexto, desde o desenvolvimento da primeira linhagem isogênica de ratos por King em 1909, mais de 1000 linhagens isogênicas de ratos foram criadas para o estudo de diversos aspectos fisiológicos e bioquímicos em diferentes doenças, como: doenças autoimunes, cardiovasculares e neurológicas (AITMAN et al., 2008).

Animais SHR, são considerados um dos modelos genéticos mais amplamente utilizados nos estudos de pressão arterial, além de serem aplicados em pesquisas relacionadas ao: Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) (SAGVOLDEN et al., 2000), ansiedade, memória e aprendizado (DE MEDEIROS et al., 2013). Esses fenótipos estão também correlacionados aos aspectos neuroquímicos, como hipofunção dopaminérgica, hiperativação adrenérgica (RUSSELL, 2002), prejuízos no influxo de cálcio (LEHOHLA et al., 2004) e diminuição nos níveis de AMPc (MARCIL et al., 1997). Apesar dos avanços nos estudos demonstrarem o envolvimento da microbiota com o sistema cardiovascular nesse grupo de animais, ainda faltam estudos direcionados à relação do seu microbioma com as suas alterações neuroquímicas e comportamentais.

Outro ponto importante discutido na literatura demonstra que o comportamento hiperativo apresentado pela linhagem SHR tem sido questionado, pois a linhagem WKY normalmente usada como seu controle em estudos avaliando problemas

cardiovasculares e comportamentais, é considerada hipotativa, colocando em dúvida a validade da comparação entre as duas linhagens (ROBERTSON et al., 2008). Assim, se fazem necessários estudos que busquem a validação de outros modelos genéticos para o avanço da compreensão dos transtornos neurológicos.

Dessa forma, uma nova linhagem de ratos denominada como SLA16 (SHR.LEW-Anxrr16) foi criada no Laboratório de Genética do Comportamento (LGC) através de sucessivos retrocruzamentos entre ratos Lewis (LEW) e SHR. Assim, foi obtida uma linhagem que contém todo o genoma da linhagem SHR (receptora) com exceção de uma região do cromossomo 4 proveniente da linhagem LEW (doadora) (**Figura 1**). Estudos indicam que essa região genômica diferencial (RGD) está relacionada aos comportamentos de ansiedade, principalmente quando avaliado através da locomoção central no Campo Aberto (RAMOS et al., 1999).



**Figura 1. Imagem ilustrativa da relação genômica entre as linhagens LEW, SHR e SLA16.** A linhagem SLA16 é geneticamente idêntica à SHR com exceção de uma parte do cromossomo 4, que é proveniente da linhagem LEW. (Figura elaborada com base no site <www.mindthegraph.com> e ferramentas do Corel Photo-Paint 2018).

Após a construção bem-sucedida da linhagem congênica SLA16, estudos já demonstraram que além de exibir menor índice de comportamento relacionado à ansiedade ela também apresenta um aumento geral da atividade locomotora, prejuízos de memória aversiva e menor pressão arterial sistólica (PAS) se

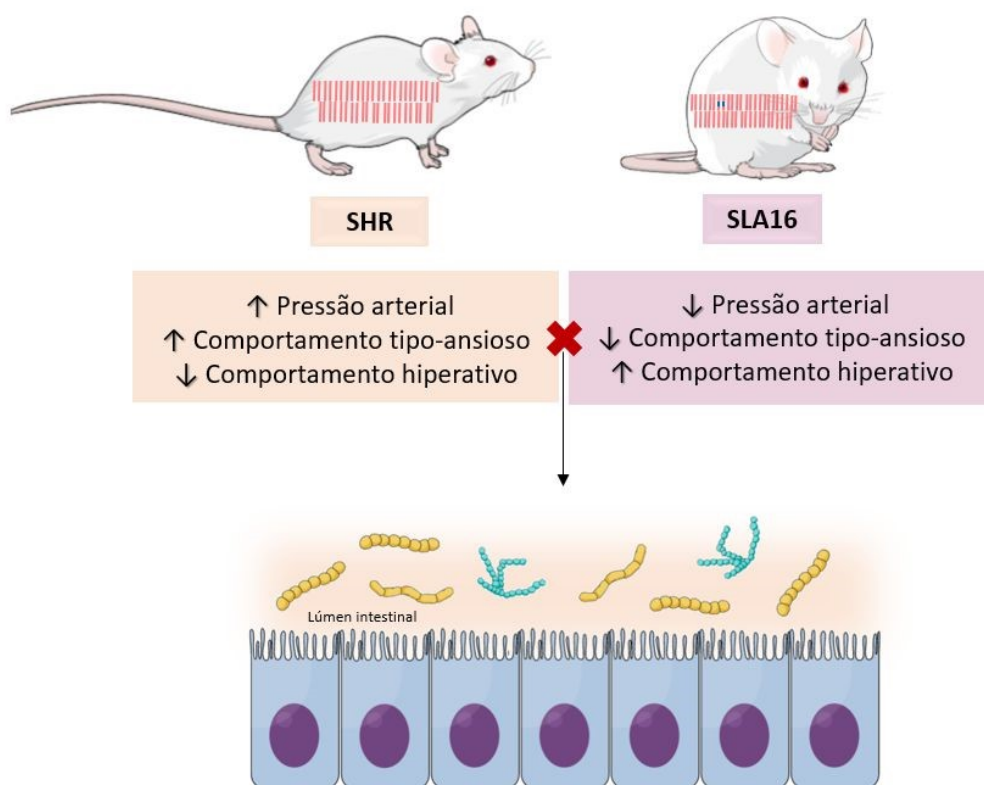
comparados à parental SHR (DE MEDEIROS et al., 2013; ANSELMINI et al., 2016, DOS ANJOS, 2017), sendo que, esses efeitos contrastantes apresentam-se ainda mais evidentes frente as fêmeas de ambas as linhagens (DE MEDEIROS et al., 2013). Apesar de não sabermos ainda o porquê dessa diferença sexual, há décadas vêm surgindo diversas evidências sobre influências sexuais e hormonais no comportamento, incluindo emoção, memória, visão, audição, percepção da dor, navegação, níveis de neurotransmissores (CAHILL, 2006). Além de já serem propostos efeitos significativos dos hormônios sobre os mecanismos de controle neuronal e renal da pressão arterial (KHALIL et al., 2005), que podem apresentarem-se associados.

#### 1.5. JUSTIFICATIVA

Relatos de uma década de estudos destacam a microbiota como um sistema capaz de influenciar a pressão arterial e comportamentos complexos relacionados à emocionalidade, atividade motora, estresse e aprendizado/memória. Diversos aspectos da pressão arterial, comportamento e neuroquímica das linhagens de ratos SHR e SLA16 permanecem sem uma explicação completa, culminando na necessidade de mais informação. Uma técnica exploratória atraente e simples para determinar se a microbiota pode estar envolvida em alterações fisiológicas e comportamentais é através da eliminação das bactérias de um animal através do tratamento com uma combinação de antibióticos de amplo espectro ou usando animais e instalações livres de germes.

Até o momento acreditava-se que as diferenças fenotípicas entre as linhagens SHR e SLA16 eram atribuídas ao *locus* diferencial, porém, evidências crescentes da interferência da microbiota intestinal em diversos processos patológicos nos levaram à pergunta: **Qual a relação da microbiota com os processos fisiológicos e comportamentais diferenciais apresentados por essas duas linhagens?** De acordo com esse questionamento e as informações apresentadas anteriormente, postulou-se a seguinte hipótese:

A microbiota intestinal de ratos SHR e SLA16 é responsável, ao menos em parte, pelas diferenças comportamentais e de pressão arterial encontradas entre as linhagens (**Figura 2**).



**Figura 2.** Representação ilustrativa referente a hipótese do presente trabalho (Figura elaborada com base no site <[www.mindthegraph.com](http://www.mindthegraph.com)> e ferramentas do Corel Photo-Paint 2018).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a participação da microbiota no desenvolvimento de alterações comportamentais e de pressão arterial entre as linhagens SHR e SLA16.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (Bloco experimental 1) Avaliar a influência do ciclo estral na pressão arterial e comportamento de ratas das linhagens SHR e SLA16;
- (Bloco experimental 2) Avaliar os efeitos do tratamento com antibióticos sobre a pressão arterial e comportamento de ratas das linhagens SHR e SLA16;
- (Bloco experimental 3) Avaliar os efeitos do tratamento com antibióticos e posterior transplante da microbiota fecal sobre a pressão arterial e comportamento de ratas das linhagens SHR e SLA16;

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

Foram utilizadas 126 ratas fêmeas das linhagens *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR) e SLA16 (SHR.LEW-Anxrr16) com idade entre 4 e 5 meses (idade adulta), criadas no Laboratório de Genética do Comportamento da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em caixas-moradia acondicionadas em ambiente com ventilação e temperatura controladas ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), com ciclo claro/escuro de 12h/12h (luzes acesas às 07:00h) e água e alimento *ad libitum*. Ao início do tratamento, os animais foram realocados a um biotério com estantes ventiladas e com sistemas de filtração de ar. Os materiais como caixas, grades, maravalha, e bebedouros com água foram previamente autoclavados para evitar contaminação bacteriana dos animais tratados. Para reduzir o estresse durante a experimentação os animais utilizados no trabalho passaram por uma habituação à experimentadora, onde foram gentilmente manuseados na semana que antecede o início dos experimentos.

Todos os procedimentos de manuseio animal foram realizados de acordo com as diretrizes nacionais e da Comissão de Ética no Uso de Animais local (CEUA/UFSC), conforme protocolos PP00903 e 6476290719.

#### 3.2. BEM-ESTAR ANIMAL

Com o intuito de monitorar a saúde dos animais, diariamente (período da manhã), todos os indivíduos passaram por medições da massa corporal, expresso em gramas (g). Como ponto final humanitário foi estabelecido uma redução de peso de 15 a 20% comparado ao início do experimento; desidratação (perda de turgor da pele após pinçamento) por mais de 48h; imobilidade mesmo ao ser estimulado; e incapacidade de ingerir água e alimento.

#### 3.3. AVALIAÇÃO DO CICLO ESTRAL

Para avaliar o ciclo reprodutivo (estral), a secreção vaginal dos animais foi coletada diariamente entre 8:00 e 9:00 horas da manhã, sendo obtida após injeção



intravaginal de 10 $\mu$ L de solução salina (NaCl 0,9 %). O material foi depositado sobre lâminas, previamente limpas e secas, cada lâmina recebendo o esfregaço vaginal de 2 animais diferentes, de forma ordenada e sem contato entre eles. Posteriormente, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico para avaliação de cada fase do ciclo. As fases do ciclo foram determinadas por citologia e pela consistência do muco vaginal.

O **proestro** (P) foi definido como muco com consistência média, predominância de células nucleadas, de nenhum a poucos leucócitos e muito pouco a nenhuma célula cornificada. O **estro** (E) foi definido como muco com consistência média a muito denso e presença apenas de células cornificadas. O **metaestro** foi definido como predominância de leucócitos, poucas células nucleadas e irregulares, poucas células cornificadas e muco com espessura de média para muito espesso. E por fim, o **diestro** (D) foi definido quando observamos predominância de leucócitos e pouquíssimas células nucleadas, muitas vezes irregulares, com muco pouco espesso (NELSON et al., 1982). Para cada animal, foi medida a duração das fases de proestro; estro; metaestro e diestro (em dias), bem como a duração total do ciclo estral. Todas as quantificações foram realizadas por um único observador (MARCONDES et al., 2002; NELSON et al., 1982).

### 3.4. AFERIÇÃO NÃO INVASIVA DA PRESSÃO ARTERIAL

A Pressão Arterial Sistólica (PAS) foi medida por método não invasivo de pletismografia de cauda em todos os blocos experimentais, entre 10h00min e 15h00min. Todos os grupos de animais estudados foram submetidos a três medidas de pressão arterial, sendo que os valores obtidos de PAS utilizadas nas análises estatísticas correspondem à média dessas três medidas. A análise é feita em sala com temperatura controlada (30°C) onde os animais são colocados para habituação 30 minutos antes de serem avaliados. As medidas foram obtidas através de um esfignomamômetro de cauda, desse modo o animal foi posicionado em um contensor apropriado para o seu tamanho que é colocado sobre uma manta de aquecimento que promove uma vasodilatação na cauda. O esfignomamômetro foi insuflado até a obstrução total do fluxo sanguíneo para a artéria caudal e em seguida a obstrução do fluxo foi diminuída lentamente até surgir os picos de PAS que são registrados em um

sistema de aquisição de dados (Programa LabChart, versão 7.0). Ao retirar cada animal do teste, o aparato foi higienizado com álcool etílico hidratado 70° INPM.

### 3.5. CULTIVO BACTERIANO DAS FEZES

Ao fim da antibioticoterapia e durante o transplante da microbiota fecal (TMF), amostras fecais das ratas foram coletadas em microtubo de 2 ml pré-pesado. Os tubos com *pellets* fecais foram mantidos em gelo, pesados e o peso dos *pellets* calculado. Os sedimentos fecais foram suspensos em solução salina estéril (100mg/mL), centrifugadas a 3.000 RPM por 1 min, à 4°C e o sobrenadante diluído em razão de 10. A solução fecal (SF; concentração  $10^6$  e  $10^3$ ) foi plaqueada em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) com auxílio de alça bacteriológica estéril. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Ao final da incubação, foram contados o número de colônias nas placas e calculado o número de bactérias por mg de fezes (REIKVAM et al., 2011).

### 3.6. IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS BACTERIANAS

Após as análises de cultivo bacteriano das fezes, as bactérias remanescentes foram isoladas e identificadas. Para tanto, as bactérias foram plaqueadas em ágar sangue com auxílio de alça bacteriológica estéril. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Ao final da incubação, foram feitos esfregaços, que após secos e fixados, foram corados pelo método de Gram e observados em objetiva de imersão, aumento final de 1000 vezes (DIAZ et al., 2002). As bactérias foram então suspensas em solução salina estéril para atingir uma turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland tal como aferido por turbidímetro densichek – Biomérieux e então identificadas por automação (Vitek 2 - Biomérieux França), utilizando os cartões de identificação para bacilos gram negativos (GN) ou para bactérias gram positivas (GP). Os Cartões foram mantidos a 35°C durante 18 horas, com leituras ópticas feitas automaticamente a cada 15 min. Com base nessas leituras, a identificação foi criada e interpretada de acordo com um algoritmo específico. Os resultados finais foram comparados com o banco de dados, gerando as identificações dos organismos desconhecidos.

### 3.7. TESTES COMPORTAMENTAIS

#### 3.7.1. Campo aberto

O Campo Aberto (CA) foi desenvolvido por Hall (1934) para medir a emocionalidade em ratos. O aparato consiste em uma caixa de madeira quadrada (100 x 100 cm), contendo uma arena em preto fosco cercada por paredes brancas, de 40 cm de altura. Os animais foram posicionados no centro do aparato e testados por 5 minutos. Posteriormente, analisaram-se os vídeos através do *software ANY-maze®* (Stoelting, USA). Ao retirar cada animal do teste, o aparato foi higienizado com álcool etílico hidratado 70° INPM. Foram avaliados os parâmetros de entradas no centro, tempo no centro, locomoção central, locomoção periférica e locomoção total percorrida. O centro foi virtualmente definido como uma área quadrada central de 60 x 60 cm, e as áreas contíguas às paredes foi considerada a área periférica.

O CA foi realizado em todos os blocos experimentais, entre 08h00min e 12h00min, com iluminação fixada em 12 lux e ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

#### 3.7.2. Labirinto em Cruz elevado

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) foi inicialmente proposto por Pellow et al. (1985) e é considerado um teste comportamental que avalia ansiedade/emocionalidade. O LCE é construído de MDF preto com uma plataforma central e quatro braços, sendo dois abertos e dois fechados por paredes laterais, dispostos de maneira oposta. Os animais foram submetidos ao LCE durante 5 min sendo colocados na plataforma central e voltados para um dos braços fechados. Durante a sessão foram registrados o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos e fechados. Após cada sessão de teste, o aparato foi higienizado com álcool etílico hidratado 70° INPM.

O LCE foi realizado no segundo e terceiro blocos experimentais, entre 13h00min e 17h00min, com iluminação fixada em 12 lux e ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

### 3.7.3. Caixa de atividade

A caixa de atividade (CA<sub>ativ</sub>) possui a finalidade de avaliar a atividade motora dos animais. Consiste em uma caixa de madeira de 70 x 27 cm (comprimento x largura) cercada por paredes com 22 cm de altura, uma tampa de acrílico transparente e um fundo metálico gradeado. Ao longo da extensão da caixa estão distribuídos três sensores infravermelhos e o número de interrupções é apresentado em um *display* digital do contador acoplado a caixa. Dessa forma, os animais foram deixados habituar ao ambiente (sala) de teste por 1 hora antes do início do teste. Após, cada animal pode explorar livremente a CA<sub>ativ</sub> durante 60 minutos e a ambulação total foi registrada.

O teste da CA<sub>ativ</sub> foi realizado no segundo bloco experimental, entre 9h00min e 17h00min, com iluminação fixada em 12 lux e ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

## 3.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS E REPRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Todos os resultados experimentais foram testados quanto sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variância pelo teste de Levene. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A maior parte das análises estatísticas foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de duas vias (tratamento e linhagem como variáveis independentes) e, quando necessário, teste *post hoc* Duncan. Para os dados de PAS e massa corporal utilizou-se ANOVA de duas vias (tratamento e linhagem como variáveis independentes) com medidas repetidas e para os dados de ciclo estral utilizamos o teste-*t Student* (não pareado).

Todos os dados experimentais foram submetidos à análise estatística no *software* Statistica®, versão 10 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). A existência de outliers está descrita nos resultados e os mesmos foram identificados após análise por teste de ROUT. Dados com valor de p menores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos. Os símbolos empregados para representar os efeitos estatísticos ( $p < 0,05$ ) foram o asterisco (\*) para efeitos de linhagem, cerquilha (#) para efeitos de tratamento, o cifrão (\$) para efeitos de interação linhagem/tratamento, e sinal tironiano (&) para efeitos de tratamento/repetição. As representações em gráfico

para esse trabalho foram geradas a partir do *software* GraphPad Prism, versão 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA).

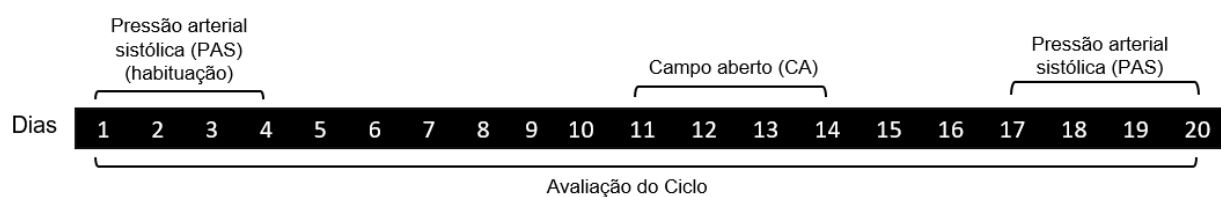
#### 4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

##### 4.1. PRIMEIRO BLOCO EXPERIMENTAL

Antes de iniciar os estudos referentes à relação da microbiota nas linhagens SHR e SLA16 foi realizado uma caracterização das linhagens, buscando definir se o ciclo estral das ratas pode levar a alterações na PAS e comportamentos observados no campo aberto. O *screening* busca validar o uso de fêmeas e a influência do seu ciclo estral em ambos os testes minimizando o uso de animais em futuros experimentos que avaliarão os mesmos parâmetros.

Dessa forma, foram utilizadas ratas com 4-5 meses que foram submetidas à avaliação do ciclo estral durante 20 dias. Após isso, no início do experimento, dias 1 a 4, foi realizada a **habituação** dos animais ao pletismógrafo. Posteriormente, nos dias 11 a 14, foi realizada avaliação comportamental no **campo aberto** e a avaliação da **pressão arterial** seguiu-se do dia 17 a 20.

O delineamento experimental e a disposição temporal dos testes podem ser observados na Figura 3.



**Figura 3. Delineamento experimental da avaliação do ciclo estral e sua influência na pressão arterial e comportamento das linhagens SHR e SLA16.** A avaliação do ciclo estral aconteceu durante 20 dias. A habituação dos animais ao pletismógrafo ocorreu do primeiro ao quarto dia. A avaliação do campo aberto foi realizada do 11º dia ao 14º dia e a avaliação final da pressão arterial se seguiu do 17º ao 20º dia.

## 4.2. SEGUNDO BLOCO EXPERIMENTAL

### 4.2.1. Administração de antibiótico

Buscando entender melhor a influência da microbiota na PAS e comportamento das linhagens SHR e SLA16 o presente bloco experimental visou a redução da microbiota intestinal através da administração de um coquetel de antibióticos de amplo espectro. Dessa forma, os animais foram divididos aleatoriamente entre um grupo ATB (Antibióticos) e SAL (Salina) para cada uma das linhagens.

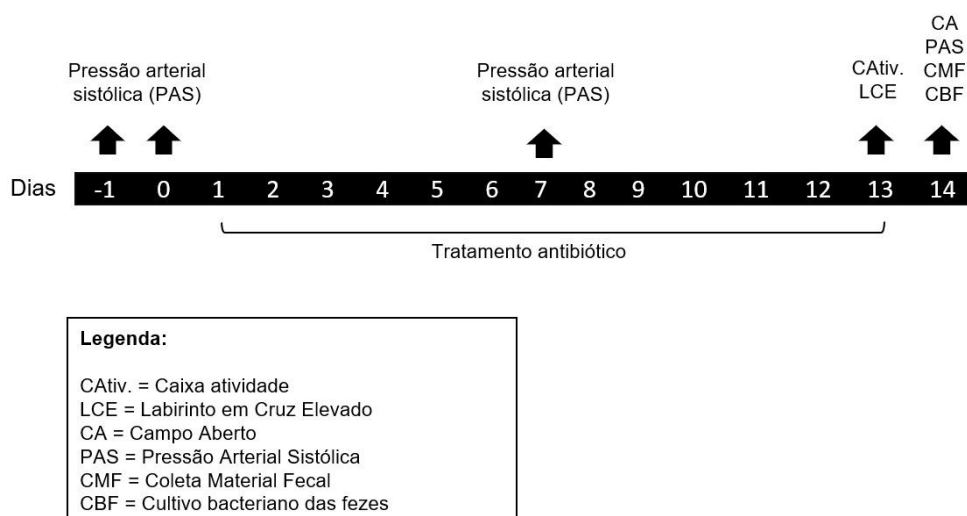
O tratamento, já descrito por Reikvam e colaboradores (2011), consistiu na administração por gavagem de anfotericina B (1 mg/kg) no primeiro e segundo dia, 12/12h. Nos dias subsequentes até o décimo terceiro dia os animais receberam um coquetel de antibióticos que inclui vancomicina (50 mg/kg), neomicina (100 mg/kg), metronidazol (100 mg/kg) e anfotericina B (1 mg/kg) administrados por gavagem de 12/12h, além de ampicilina (1 mg/mL) adicionada à água do bebedouro como demonstrado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Antibióticos utilizados ao longo do tratamento.

<b>Droga</b>	<b>Dose</b>	<b>Periodicidade</b>	<b>Duração</b>	<b>Via adm</b>
Anfotericina B	1 mg/kg	12/12h	1º ao 13º dia	Gavagem
Neomicina	100 mg/kg	12/12h	3º ao 13º dia	Gavagem
Metronidazol	100 mg/kg	12/12h	3º ao 13º dia	Gavagem
Vancomicina	50 mg/kg	12/12h	3º ao 13º dia	Gavagem
Ampicilina	1 mg/mL	-	3º ao 13º dia	Bebedouro

**Legenda:** adm = administração; mg=miligrama; kg=quilograma; mL=mililitro; h=hora

Para os experimentos realizados durante essa fase de tratamento foi feita a avaliação de **pressão arterial**, antes do início dos experimentos, sendo repetida semanalmente (nos dias -1, 0, 7, 14). Após o fim do tratamento (dias 1 a 13) foi realizado os testes de **campo aberto**, **labirinto em cruz elevado** e **caixa atividade**, além da **coleta do material fecal** e **cultivo bacteriano** (dias 13 e 14) (**Figura 4**).



**Figura 4. Delineamento experimental do tratamento com antibióticos.** Administração de antibiótico, ou salina, foi realizada a cada 12h por 13 dias. Testes de pressão arterial sistólica foram realizados antes (dia -1 e 0), durante (dia 7) e ao fim do tratamento com antibiótico (14º dia). As análises comportamentais de campo aberto, labirinto em cruz elevado e caixa atividade foram realizadas ao fim da antibioticoterapia (13º e 14º dia). A coleta do material fecal e cultivo bacteriano das fezes foram realizados após o fim do tratamento com antibiótico (14º dia). A pesagem dos animais foi realizada diariamente.

### 4.3. TERCEIRO BLOCO EXPERIMENTAL

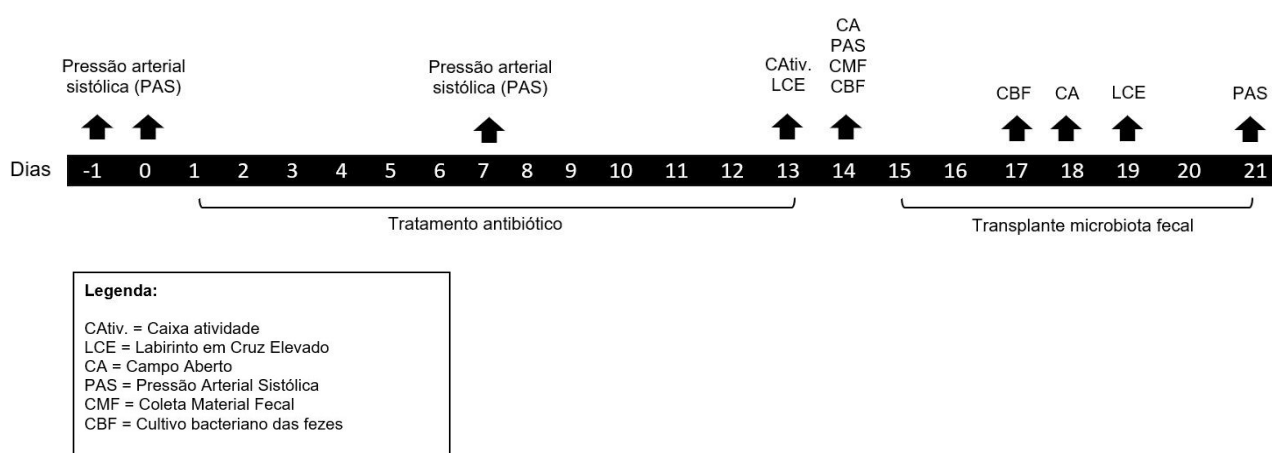
#### 4.3.1. Preparo e transplante da microbiota fecal

Com o intuito de avaliar se a microbiota poderia ser responsável pelas diferenças de comportamento e PAS, normalmente encontrada entre as linhagens SHR e SLA16, após tratamento com antibiótico (referente ao segundo bloco experimental) realizou-se o transplante da microbiota fecal (TMF). Para tanto, foi coletado e reunido o conteúdo fecal do intestino (ceco e cólon) de 5 ratas SHR e 5 ratas SLA16, separadamente, após eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub>. As ratas utilizadas nesse processo são animais que já foram utilizados em experimentos anteriores sem tratamento farmacológico visando a redução do desperdício de animais. Cada uma das amostras reunidas e homogeneizadas foram suspensas em solução salina estéril (0,9% p/v de NaCl) e centrifugadas a 3.000 RPM por 1 min à 4°C. O sobrenadante foi aliquoteado para um tubo *falcon* e adicionado glicerol 85% para proteção das células bacterianas no processo de congelamento a -80°C resultando em uma solução com

concentração final de 200mg/mL (SATOKARI et al., 2015). Para o transplante, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 12.000 rpm por 5 min à 4°C e o sedimento ressuspendido em solução salina estéril. Vinte e quatro horas após o tratamento com antibiótico (15º dia) foram administradas diariamente por gavagem a solução fecal (TMF) do doador ou salina (1 mL). Os animais tratados com salina continuaram com o mesmo tratamento e os animais tratados com antibiótico receberam o TMF, dessa forma, ratas SHR com antibiótico receberam TMF das SLA16 e ratas SLA16 com antibiótico receberam TMF de ratas SHR até o término dos experimentos e eutanásia dos animais (22º dia) (DURGAN et al., 2016).

Após alguns dias de tratamento foi realizado cultivo bacteriano (dia 17) para controle da recolonização da microbiota e no 18º dia iniciaram-se os testes comportamentais de **campo aberto** (18º dia), **labirinto em cruz elevado** (19º dia) e avaliação de **pressão arterial sistólica** (21º dia).

O delineamento experimental do tratamento e a disposição temporal dos testes podem ser observados na **Figura 5**.



**Figura 5. Delineamento experimental do tratamento com transplante da microbiota fecal.** O transplante de microbiota fecal entre as linhagens SHR e SLA16 foi realizado após 24h do tratamento com antibiótico e se prolongou até o fim dos experimentos. O cultivo bacteriano das fezes foi realizado no 17ª dia. O teste do campo aberto foi realizado no 18º dia. O teste do labirinto em cruz elevado foi realizado no 19º dia. A pressão arterial sistólica e coleta do material fecal foram realizadas no 21º dia. A pesagem dos animais foi realizada diariamente.



## 5. RESULTADOS

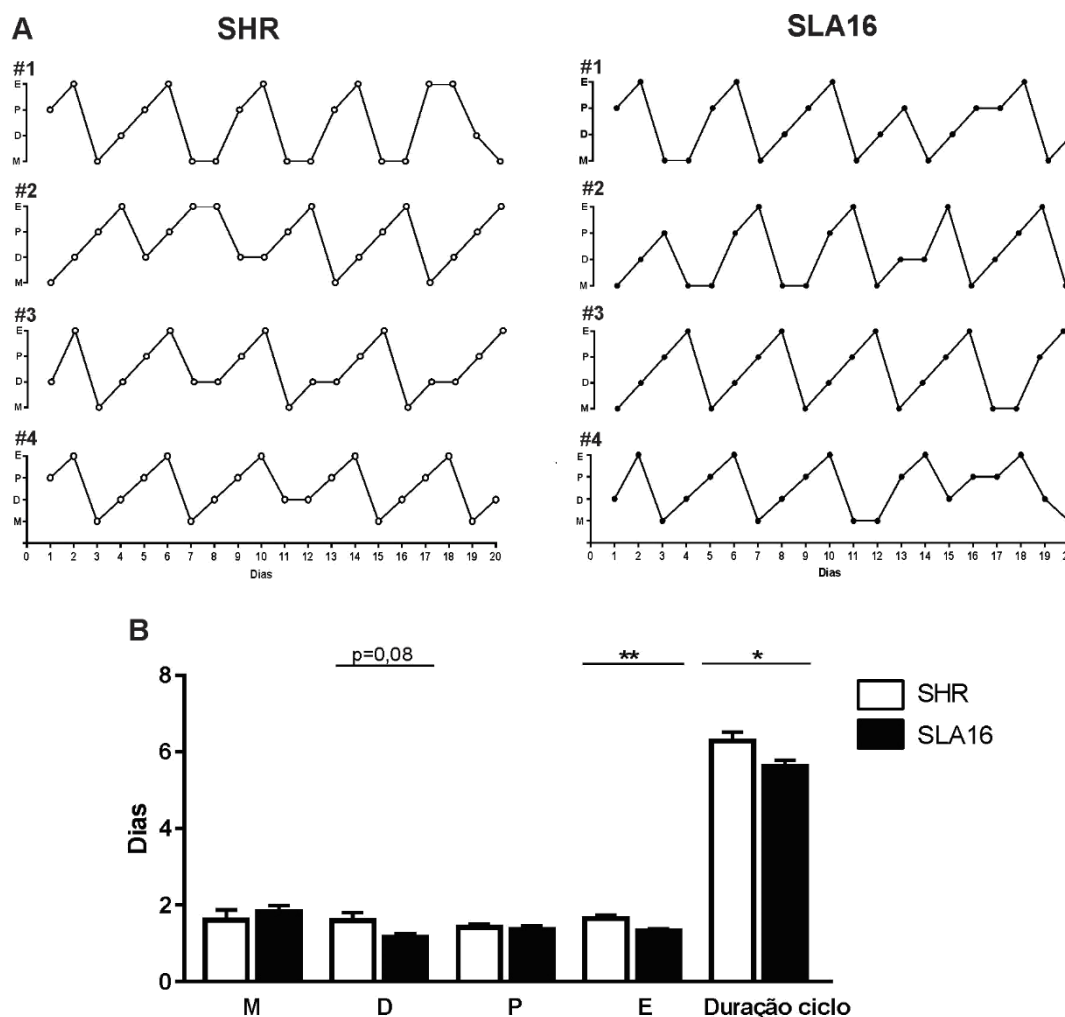
### 4.1. PRIMEIRO BLOCO EXPERIMENTAL

O primeiro bloco experimental consistiu em avaliar a influência do ciclo estral na PAS e comportamento, no campo aberto, de ratas das linhagens SHR e SLA16.

#### 4.1.1. Avaliação do ciclo estral

A análise do ciclo estral por teste-*t Student* (não-pareado) revelou que não houve alterações significativas na duração do metaestro e proestro entre as linhagens. Apesar disso, houve um efeito marginal para os dados do diestro [ $t(12)=1,914$ ;  $p=0,0798$ ] com menor duração dessa fase do ciclo na linhagem SLA16. Os dados do estro demonstraram uma diferença de linhagem significativa, com diminuição da sua duração em ratas SLA16, em relação às SHR [ $t(12)=3,209$ ;  $p=0,0075$ ]. Também foi possível evidenciar alteração significativa da duração total do ciclo estral, que foi menor em ratas SLA16, quando comparado às SHR [ $t(12)=2,23$ ;  $p=0,0456$ ] (**Figura 6B**).

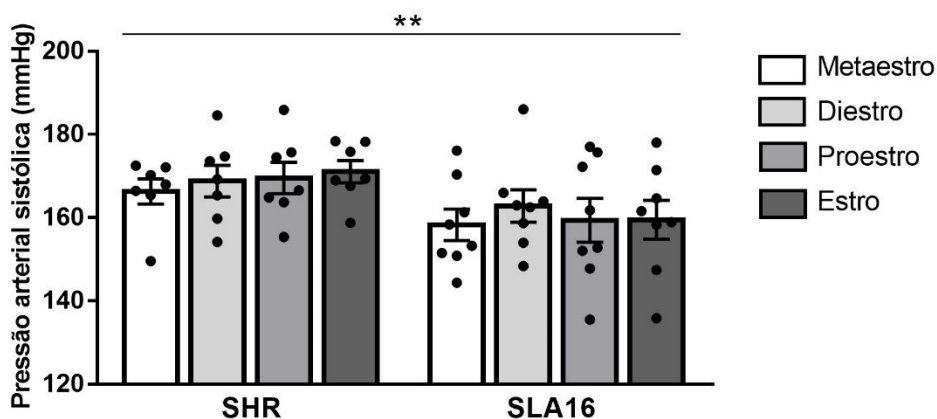
Destaca-se que após análise de ROUT um indivíduo experimental foi excluído das análises, sendo considerado *outlier* devido às alterações bruscas no ciclo estral em relação às médias do grupo (em todos os parâmetros).



**Figura 6.** Análise do ciclo estral de ratas SHR e SLA16. (A) A representação gráfica do ciclo estral de ratas SHR e SLA16, determinada por citologia vaginal durante 20 dias. (B) Representação gráfica do número de dias em cada estágio do ciclo estral e do comprimento total do ciclo (n=6-7/linhagem). Metaestro (M), Diestro (D), Proestro (P), Estro (E) e Duração do ciclo. Resultados expressos em médias dos grupos + E.P.M. \*= $p < 0,05$  e \*\*= $p < 0,01$  para efeito de linhagem (teste-t Student não pareado).

#### 4.1.2. Pressão arterial

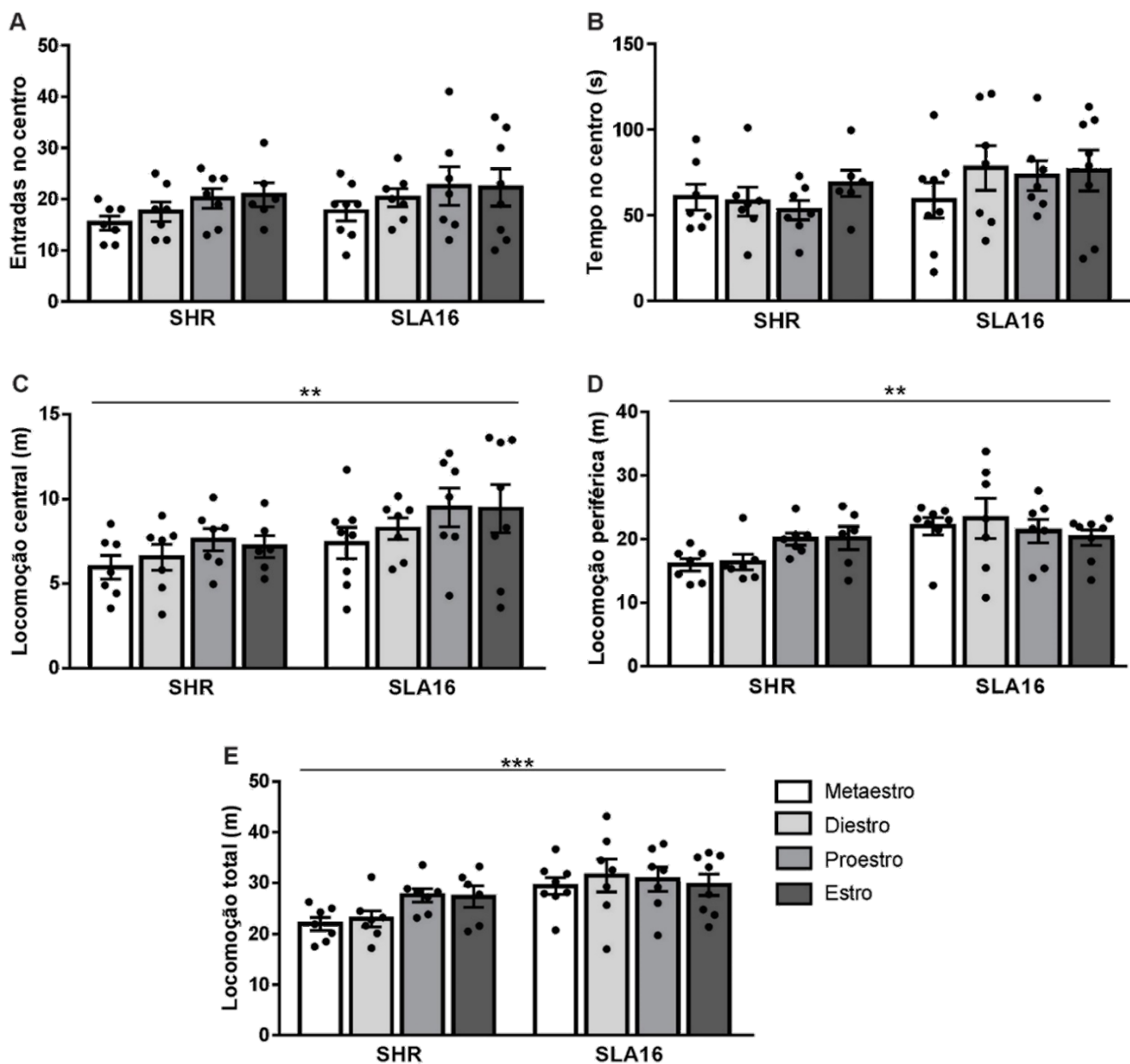
A análise de PAS nas fases do ciclo estral, analisada por ANOVA de duas vias, revelou diferença de linhagem [ $F(1,52)=9,8134$ ;  $p=0,00284$ ] (**Figura 7**), demonstrando maior PAS em ratas SHR comparadas às SLA16. Não foi observada significância estatística em relação às fases do ciclo, evidenciando que, o mesmo não interfere na pressão de ambas as linhagens (**Figura 7**).



**Figura 7.** Representação gráfica dos resultados de pressão arterial sistólica nos ratos SHR e SLA16 nas fases do ciclo estral (n=6-7/linhagem). Resultados expressos em médias dos grupos + E.P.M. \*\* =  $p < 0,01$  para efeito de linhagem (ANOVA de duas vias).

#### 4.1.3. Campo aberto

Os dados de campo aberto comparando as diferentes fases do ciclo estral, por ANOVA de duas vias, demonstram efeito significativo de linhagem nos parâmetros de locomoção central [ $F(1,49)=7,4104$ ;  $p=0,00896$ ] (**Figura 8C**); locomoção periférica [ $F(1,49)=8,7825$ ;  $p=0,00468$ ] (**Figura 8D**); e locomoção total [ $F(1,49)=13,610$ ;  $p=0,00056$ ] (**Figura 8E**) com maior locomoção da linhagem SLA16 em relação à SHR em todos os parâmetros. No entanto, não houve efeitos significativos em relação às fases do ciclo estral.



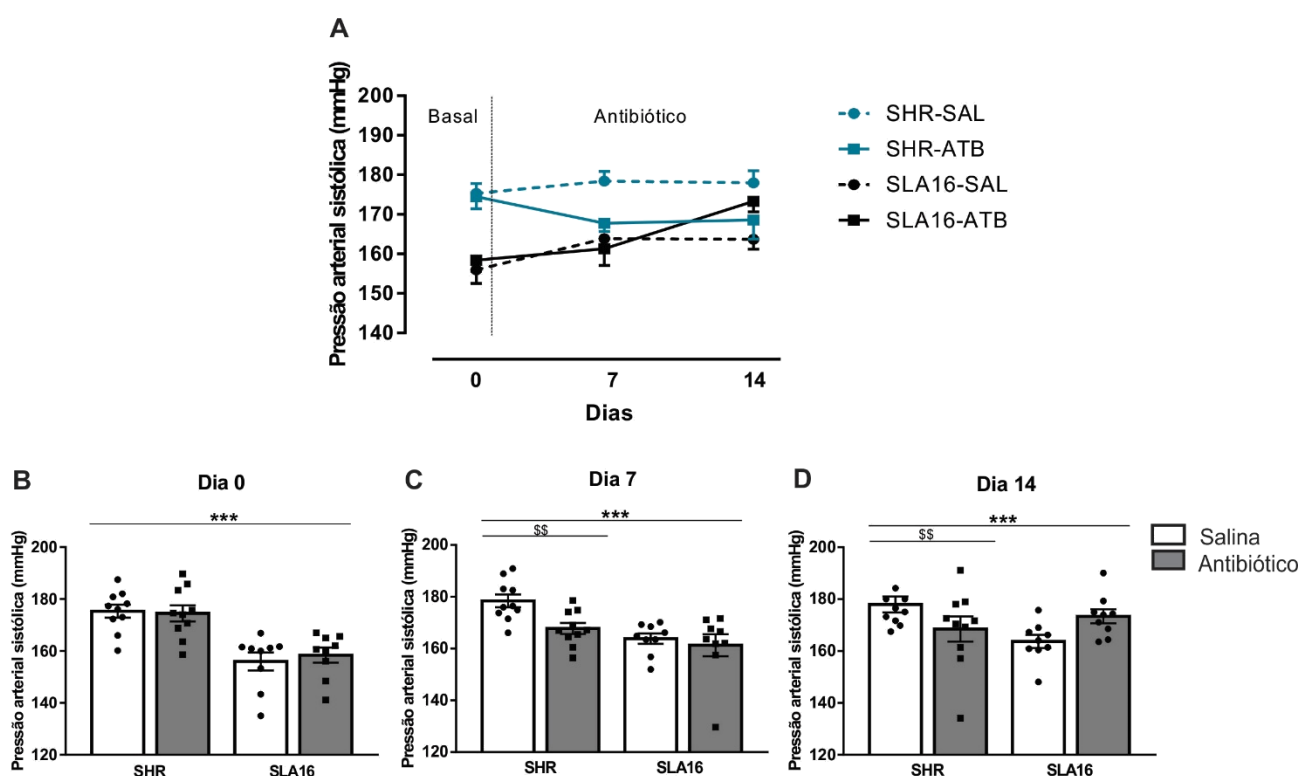
**Figura 8.** Representação gráfica dos resultados de campo aberto nos ratos SHR e SLA16 nas fases do ciclo estral (n=6-7/linhagem). (A) entradas no centro, (B) tempo no centro, (C) locomoção central, (D) locomoção periférica e (E) locomoção total. Resultados expressos em médias dos grupos + E.P.M. \*\* =  $p < 0,01$  e \*\*\* =  $p < 0,001$  para efeito de linhagem (ANOVA de duas vias).

#### 4.2. SEGUNDO BLOCO EXPERIMENTAL

Com a finalidade de investigar os efeitos da microbiota sobre a PAS e comportamento nas linhagens SHR e SLA16, no presente bloco experimental foram realizadas modificações da microbiota, através da administração de um coquetel de antibióticos.

#### 4.2.1. Pressão arterial

A análise das medidas de PAS, do segundo protocolo experimental, realizada por ANOVA de duas vias para o dia 0 (basal), revelou um efeito de fator linhagem [F(1, 34)=35,225,  $p < 0,000001$ ; SHR>SLA16] não sendo possível observar efeitos de tratamento, evitando assim, o viés entre grupos pré-tratamento (**Figura 9B**). As análises referentes aos dias 7 e 14 foram realizadas através de ANOVA de duas vias com medidas repetidas, ao qual o efeito fator linhagem se repete [F(1, 34)=9,0364,  $p = 0,00495$ ; SHR>SLA16]. Além disso, foi encontrado um efeito de interação linhagem e tratamento [F(1, 34)=7,2356,  $p = 0,01100$ ] onde o *post hoc* de Duncan mostrou redução significativa da PAS da linhagem SHR (0,00829) somente no grupo tratado com antibióticos (**Figura 9B e 9C**).

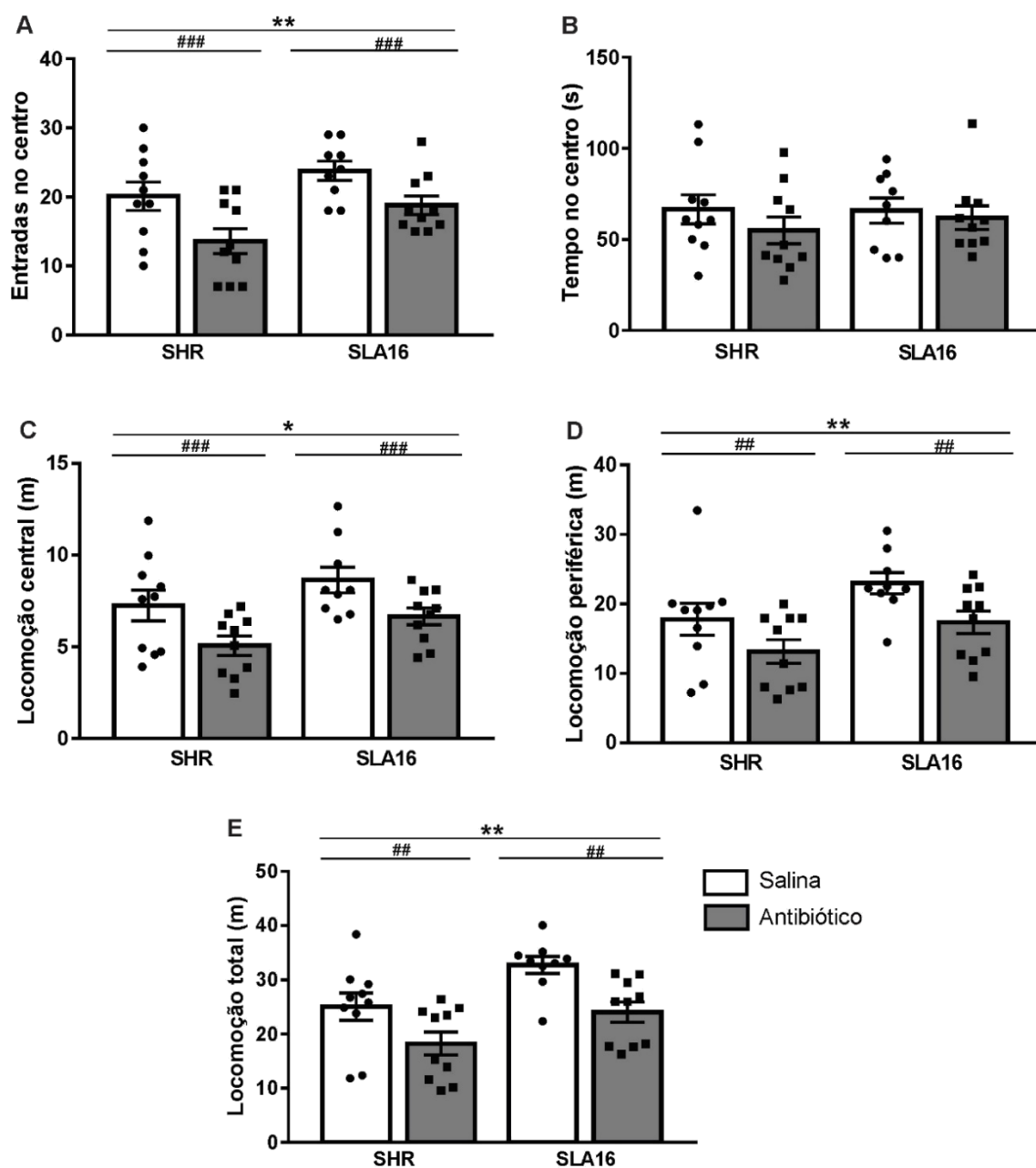


**Figura 9.** Representação gráfica dos resultados de pressão arterial sistólica (PAS) nos ratos SHR e SLA16 tratados com coquetel de antibiótico e salina (n = 9-10/grupo). (A) representação gráfica geral das medidas de pressão arterial sistólica, (B) Pressão arterial sistólica dia 0 (basal), (C) Pressão arterial sistólica dia 7 (antibiótico), (D) Pressão arterial sistólica dia 14 (antibiótico). Resultados expressos em médias dos grupos + E.P.M. \*\*\* =  $p < 0,001$  para efeito de linhagem. \$\$ =  $p < 0,01$  para interação linhagem

e tratamento (ANOVA de duas vias, ANOVA de duas vias com medidas repetidas e post hoc de Duncan).

#### 4.2.2. Campo aberto

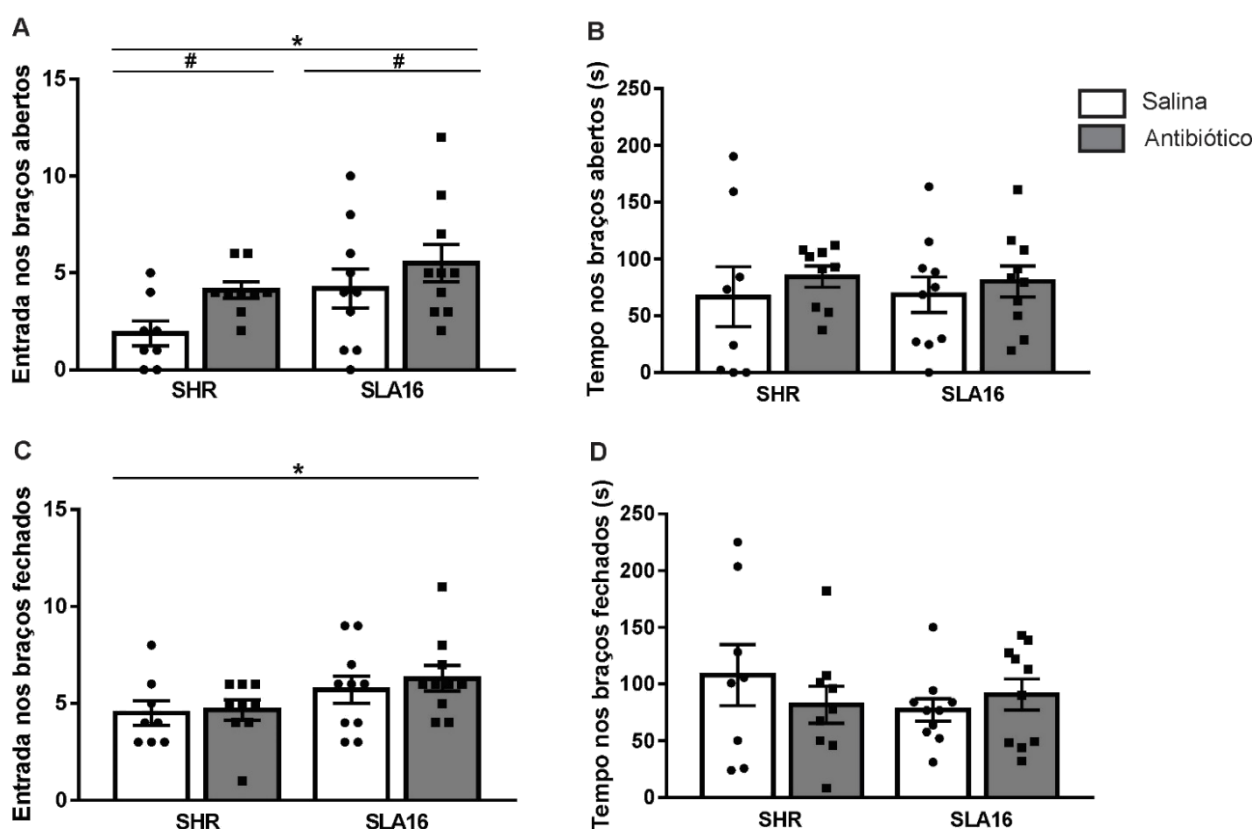
Na análise de campo aberto durante o tratamento com antibiótico, a ANOVA de duas vias revelou efeitos do fator linhagem nos parâmetros de entradas no centro [F(1,35)=6,8858; p=0,01279; SLA16>SHR] (**Figura 10A**); locomoção central [F(1,35)=9,5025; p=0,00399; SLA16>SHR] (**Figura 10C**); locomoção periférica [F(1,35)=6,5731; p=0,01481; SLA16>SHR] (**Figura 10D**); e locomoção total [F(1,35)=10,492; p=0,00263; SLA16>SHR] (**Figura 10E**). Um efeito de tratamento foi revelado nos parâmetros de entradas no centro [F(1,35)=11,510; p=0,00173; SAL>ATB] (**Figura 10A**); locomoção central [F(1,35)=15,839; p=0,00033; SAL>ATB] (**Figura 10C**); locomoção periférica [F(1,35)=7,8216; p=0,00833; SAL>ATB] (**Figura 10D**); e locomoção total [F(1,35)=13,913; p=0,00068; SAL>ATB] (**Figura 10E**) demonstrando que o antibiótico causa diminuição no número de entradas no centro e locomoção em todas as áreas do aparato, em ambas as linhagens. Não foi encontrado efeito de interação entre linhagem e tratamento.



**Figura 10.** Representação gráfica dos resultados de campo aberto nos ratos SHR e SLA16 tratados com coquetel de antibiótico ou salina (n = 9-10/grupo). (A) entradas no centro, (B) tempo no centro, (C) locomoção central, (D) locomoção periférica e (E) locomoção total. Resultados expressos em médias dos grupos + E.P.M. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$  para efeito de linhagem. ## =  $p < 0,01$  e ### =  $p < 0,001$  para efeito de tratamento (ANOVA de duas vias).

### 4.2.3. Labirinto em cruz elevado

No teste do Labirinto em cruz elevado, a ANOVA de duas vias demonstrou efeito de linhagem para a entrada nos braços abertos [ $F(1,33)=4,9263$ ;  $p=0,03344$ ; SLA16>SHR] (**Figura 11A**) e entrada nos braços fechados [ $F(1,33)=4,8909$ ;  $p=0,03403$ ; SLA16>SHR] (**Figura 11C**), revelando um valor maior de ambos os parâmetros para a linhagem SLA16 em relação à SHR. Além disso, um efeito de tratamento foi observado para a entrada nos braços abertos [ $F(1,33)=4,4659$ ;  $p=0,04222$ ; SAL<ATB] (**Figura 11A**) com um valor maior em ambas as linhagens tratadas. Não foi possível observar efeito de interação entre linhagem e tratamento.

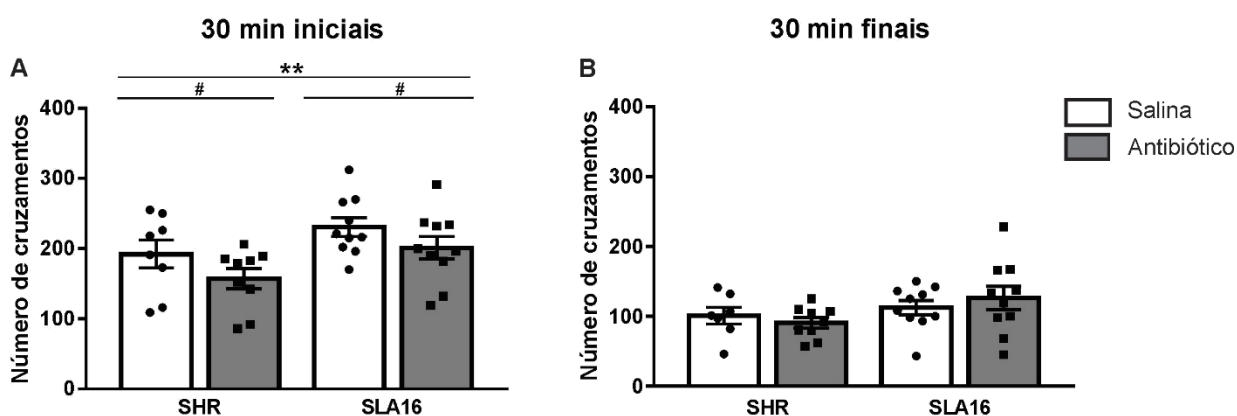


**Figura 11.** Representação gráfica dos resultados do labirinto em cruz elevado nos ratos SHR e SLA16 tratados com coquetel de antibiótico ou salina ( $n = 8-10$ /grupo). (A) Entrada nos braços abertos, (B) T tempo nos braços abertos, (C) entrada nos braços fechados, (D) tempo nos braços fechados. Resultados expressos em médias dos grupos + E.P.M.  $*=p<0,05$  para efeito de linhagem.  $\#=p<0,05$  para efeito de tratamento. (ANOVA de duas vias).



#### 4.2.4. Caixa de atividade

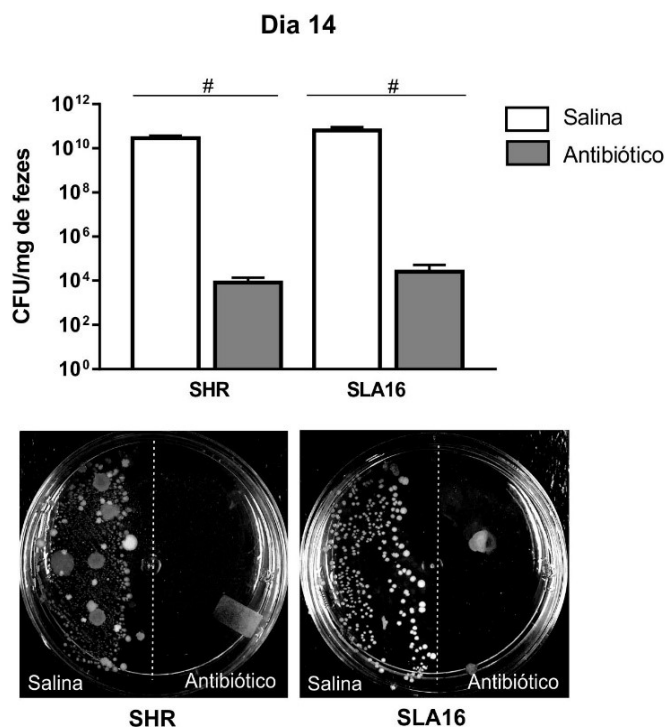
No teste da caixa de atividade, a ANOVA de duas vias evidenciou efeito de linhagem nos primeiros 30 minutos de teste com maior locomoção de ratas SLA16 em comparação às SHR [F(1,33)=6,7918; p=0,01364] (**Figura 12A**). Da mesma forma, foi revelado também efeito de tratamento somente durante os 30 minutos iniciais [F(1,33)=4,1452; p=0,04984] (**Figura 12A**), ao qual, o tratamento com antibiótico reduziu a locomoção de ambas as linhagens. Durante os 30 minutos finais do teste, não foram evidenciados efeitos de linhagem, tratamento ou interação entre linhagem e tratamento.



**Figura 12.** Representação gráfica dos resultados de caixa atividade nos ratos SHR e SLA16 tratados com coquetel de antibiótico ou salina (n = 8-10/grupo). (A) Número de cruzamento nos 30 minutos iniciais de teste, (B) número de cruzamento nos 30 minutos finais de teste. Resultados expressos em médias dos grupos + E.P.M. \*\*=p<0,01 para efeito de linhagem. #=p<0,05 para efeito de tratamento (ANOVA de duas vias).

#### 4.2.5. Cultivo bacteriano

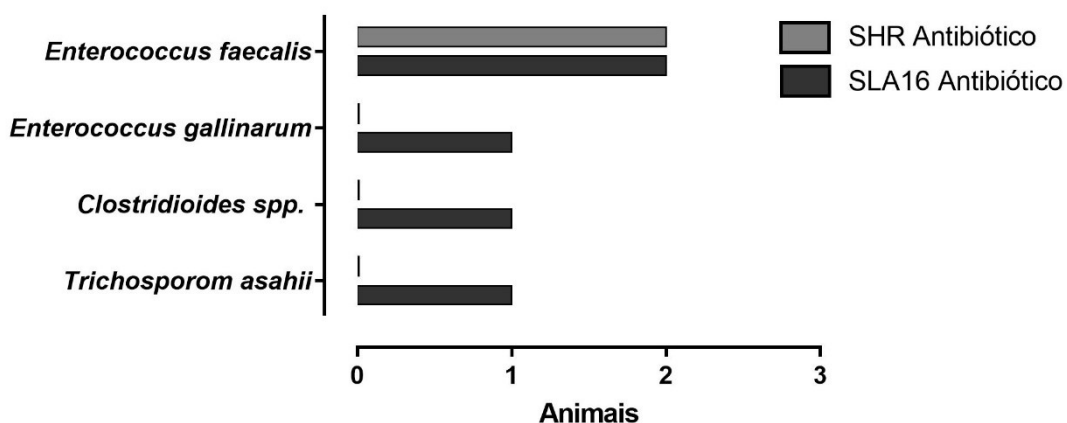
Para os dados de cultivo bacteriano das fezes, a ANOVA de duas vias evidenciou efeito de tratamento no 14º dia [F(3,21)=4,46; p=0,0142] demonstrando que o uso do antibiótico foi efetivo na redução da microbiota fecal em ambas as linhagens (**Figura 13**). Não foram revelados efeitos do fator linhagem e interação entre linhagem e tratamento.



**Figura 13.** Representação gráfica e imagens dos resultados de cultivo bacteriano das fezes de ratos SHR e SLA16 tratados com coquetel de antibiótico ou salina no 14º dia (n = 8-10/grupo). Resultados expressos em médias dos grupos + E.P.M. # = p<0,05 para efeito de tratamento (ANOVA de duas vias).

#### 4.2.5. Identificação de cepas bacterianas

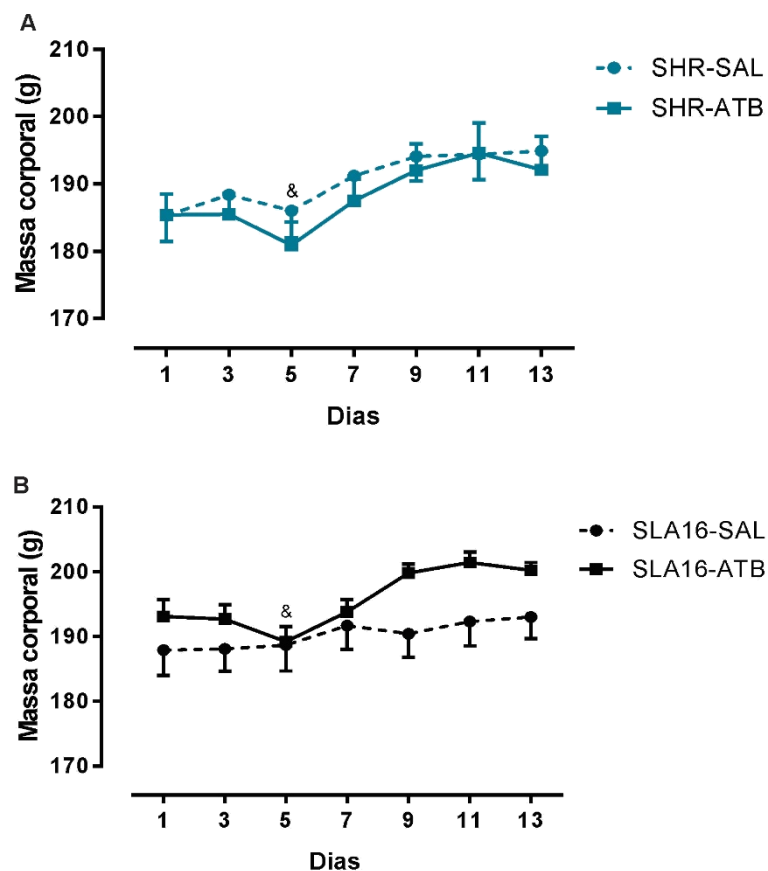
Após o cultivo bacteriano das fezes, as bactérias remanescentes após antibioticoterapia foram isoladas e identificadas. Dessa forma, foram identificadas as bactérias *Enterococcus faecalis* em quatro amostras fecais, duas para cada linhagem. *Enterococcus faecalis*, *Clostridioides spp.* em uma amostra de SLA16 cada. E isolamento de um fungo *Trichosporom asahii* em uma amostra fecal de SLA16 (**Figura 14**).



**Figura 14.** Representação gráfica de bactérias e fungo isolados e identificados após antibioticoterapia.

#### 4.3.5. Massa corporal

Os resultados das mensurações de massa corporal ao longo do protocolo que consiste no segundo bloco experimental foram analisados e expressos em gramas e a ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou somente um efeito de tratamento e repetição [ $F(13,442)=4,0345$ ;  $p>0,00001$ ] (**Figura 15**). Em seguida, o *post hoc* de Duncan demonstrou um efeito significativo no 5º dia de tratamento com antibiótico, onde ambas as linhagens apresentaram redução da massa corporal comparado aos demais dias ( $p<0,05$ ).



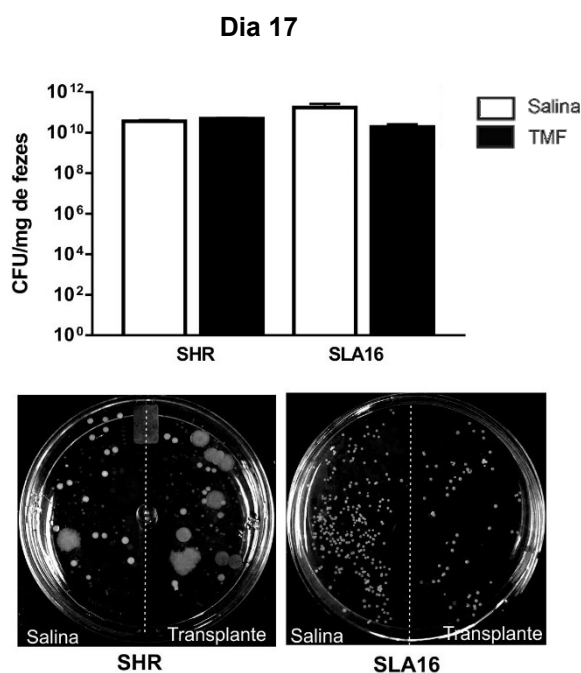
**Figura 15.** Representação gráfica do acompanhamento da massa corporal de ratos submetidos ao protocolo do segundo bloco experimental (n=8-10/grupo). (A) Massa corporal em gramas de ratos SHR, (B) Massa corporal em gramas de ratos SLA16. Resultados expressos em médias dos grupos + E.P.M. & =  $p < 0,05$  para interação repetição e tratamento (ANOVA de duas vias com medidas repetidas e post hoc de Duncan).

#### 4.3. TERCEIRO BLOCO EXPERIMENTAL

Com a finalidade de investigar se a microbiota tem um papel nas diferenças de comportamento e PAS, encontradas entre as linhagens SHR e SLA16, no presente bloco foi realizado a administração de coquetel de antibiótico seguido de TMF.

### 4.3.1. Cultivo bacteriano

Para os dados de cultivo bacteriano das fezes referentes ao 18º dia, durante o TMF, a ANOVA de duas vias não apresentou mais efeitos de tratamento, revelando que o transplante possibilitou a recolonização da microbiota (**Figura 16**).

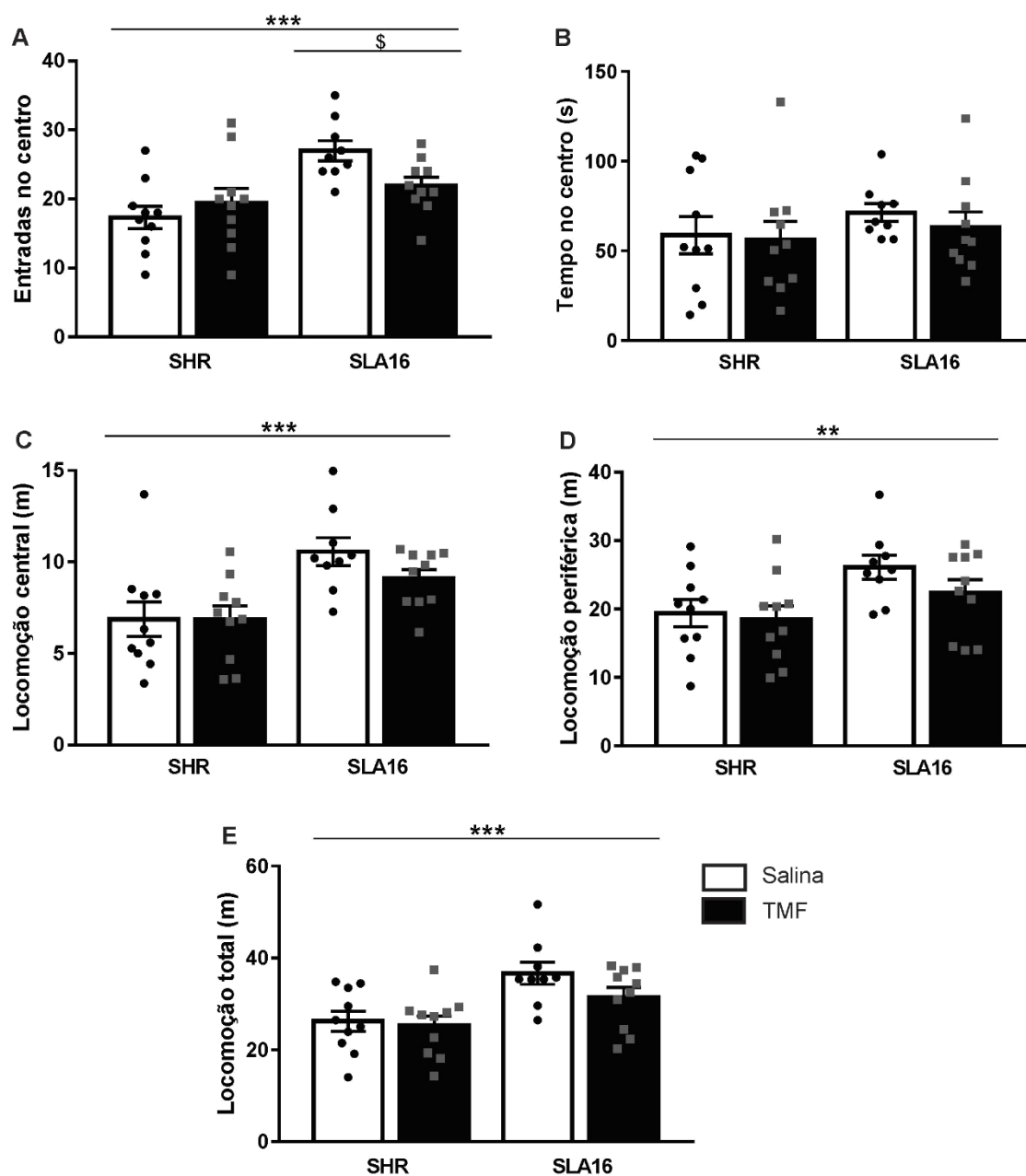


**Figura 16.** Representação gráfica e imagens dos resultados de cultivo bacteriano das fezes de ratos SHR e SLA16 tratados com TMF ou salina no 17º dia (n= 8-10/grupo). Resultados expressos em médias dos grupos + E.P.M. (ANOVA de duas vias).

### 4.3.2. Campo aberto

Durante o TMF foi realizado o teste de CA. A ANOVA de duas vias revelou efeito de linhagem para: entradas no centro [ $F(1,35)=13,547$ ;  $p=0,00078$ ; SLA16>SHR] (**Figura 17A**); locomoção central [ $F(1,35)=15,823$ ;  $p=0,00033$ ; SLA16>SHR] (**Figura 17C**); locomoção periférica [ $F(1,35)=7,5649$ ;  $p=,00936$ ; SLA16>SHR] (**Figura 17D**); e locomoção total [ $F(1,35)=14,008$ ;  $p=0,00065$ ; SLA16>SHR] (**Figura 17E**). Os efeitos de tratamento vistos com uso de antibiótico em relação à locomoção das linhagens foram perdidos após TMF, sendo evidenciado somente um efeito de interação entre linhagem e tratamento em relação às entradas no centro [ $F(1,35)=4,7182$ ;  $p=0,03671$ ], onde o *post hoc* de Duncan revelou a

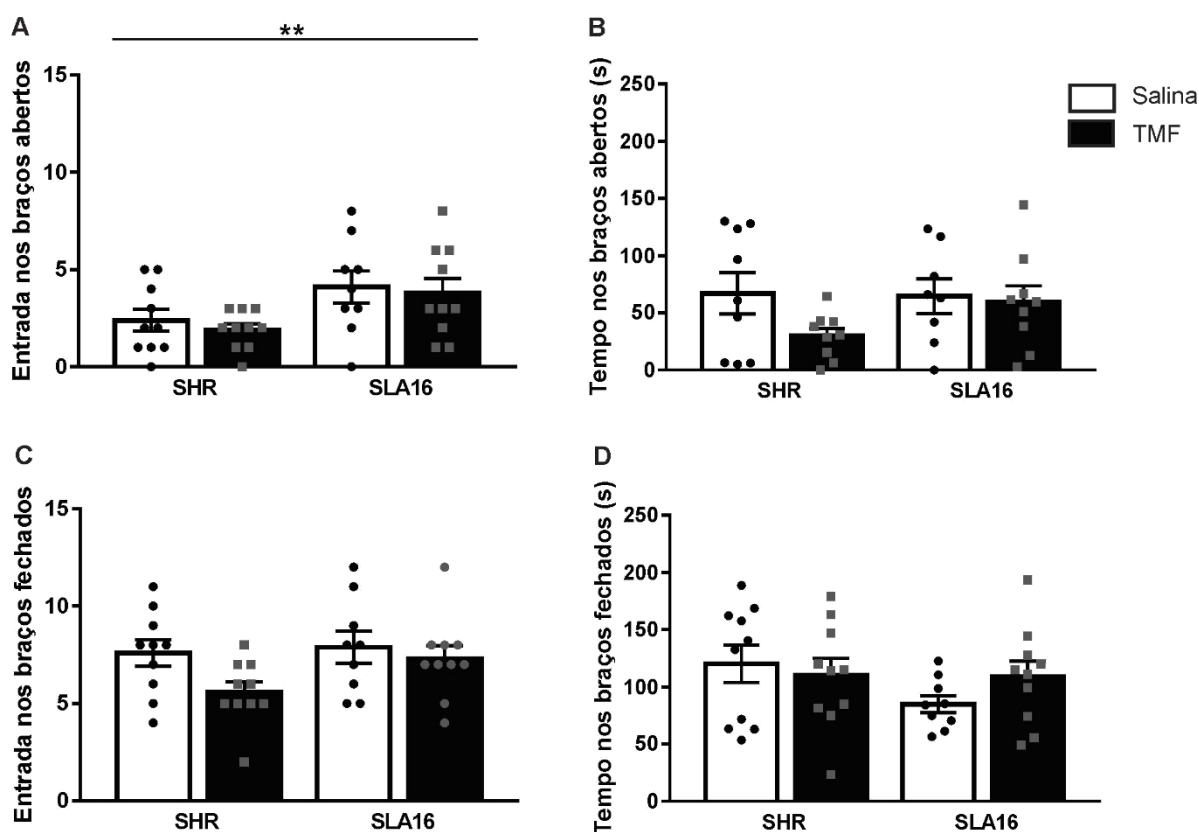
diminuição no número de entradas somente no grupo TMF da linhagem SLA16 ( $p=0,03650$ ) (**Figura 17A**).



**Figura 17.** Representação gráfica dos resultados de campo aberto nos ratos SHR e SLA16 tratados com TMF ou salina ( $n = 9-10/\text{grupo}$ ). (A) entradas no centro, (B) tempo no centro, (C) locomoção central, (D) locomoção periférica e (E) locomoção total. Resultados expressos em médias dos grupos + E.P.M. \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$  para efeito de linhagem. \$ =  $p < 0,05$  para interação linhagem e tratamento (ANOVA de duas vias e post hoc de Duncan).

### 4.3.3. Labirinto em cruz elevado

Ainda durante o transplante da microbiota fecal, o teste LCE, analisado através de ANOVA de duas vias, evidenciou efeito de linhagem com maior número de entradas no centro da linhagem SLA16 em comparação à SHR [F(1,35)=8,1757; p=0,00711] (**Figura 18A**). Não foram observados efeitos de tratamento e interação entre linhagem e tratamento.

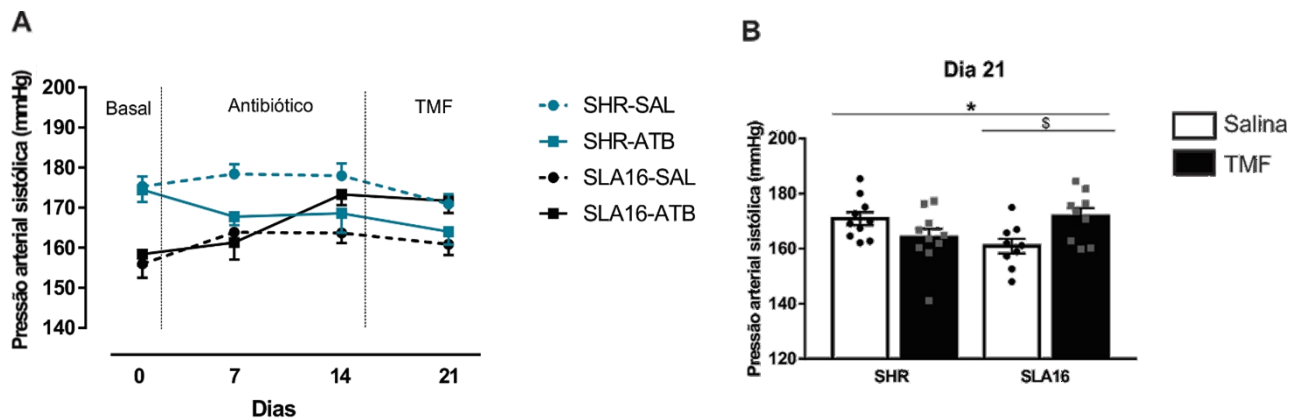


**Figura 18.** Representação gráfica dos resultados do labirinto em cruz elevado nos ratos SHR e SLA16 tratados com TMF ou salina (n = 8-10/grupo). (A) Entrada nos braços abertos, (B) tempo nos braços abertos, (C) entrada nos braços fechados, (D) tempo nos braços fechados. Resultados expressos em médias dos grupos + E.P.M. \*\*=p<0,01 para efeito de linhagem (ANOVA de duas vias).

### 4.3.4. Pressão arterial sistólica

A medida de PAS do terceiro protocolo experimental, realizada durante o TMF foi analisada por ANOVA de duas vias. Esta, revelou um efeito de fator linhagem [F(1, 34)=,17838; p=0,02292; SHR>SLA16] e efeitos de interação linhagem e tratamento

[ $F(1, 34)=9,6505$ ;  $p=0,00381$ ] onde o *post hoc* de Duncan mostrou aumento significativo da PAS somente no grupo TMF da linhagem SLA16 ( $p=0,01779$ ) (**Figura 19B**).

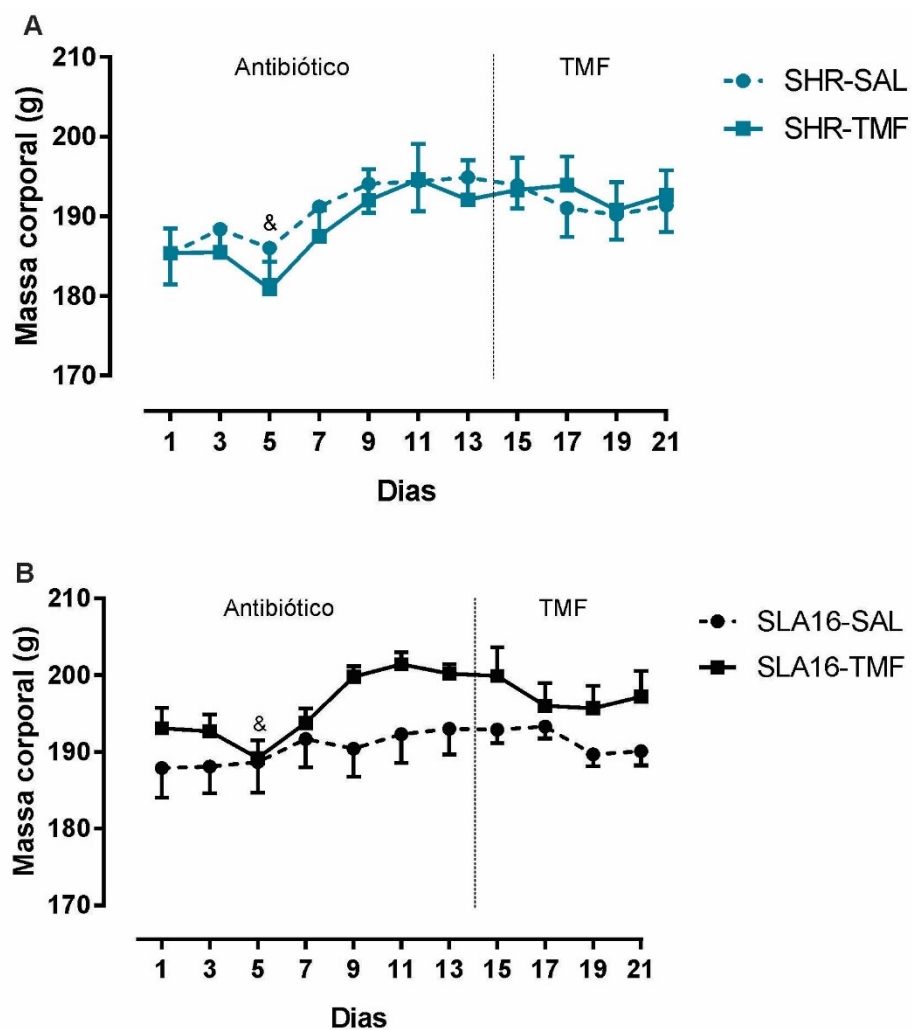


**Figura 19.** Representação gráfica dos resultados de pressão arterial sistólica (PAS) nos ratos SHR e SLA16 tratados com antibiótico seguido de TMF ou salina ( $n = 9-10/\text{grupo}$ ). (A) representação gráfica geral das medidas de pressão arterial sistólica, (B) Pressão arterial sistólica dia 21 (TMF). Resultados expressos em médias dos grupos + E.P.M. \* =  $p<0,05$  para efeito de linhagem. \$ =  $p<0,05$  para interação linhagem e tratamento (ANOVA de duas vias e *post hoc* de Duncan).

#### 4.3.5. Massa corporal

Os resultados das mensurações de massa corporal ao longo do protocolo, que consiste no terceiro bloco experimental, foram analisados e expressos em gramas e a ANOVA de duas vias com medidas repetidas não revelou efeitos (**Figura 20**).





**Figura 20.** Representação gráfica do acompanhamento da massa corporal de ratos submetidos ao protocolo do terceiro bloco experimental (n=8-10/grupo). (A) Massa corporal em gramas de ratos SHR, (B) Massa corporal em gramas de ratos SLA16. Resultados expressos em médias dos grupos + E.P.M. (ANOVA de duas vias com medidas repetidas e post hoc de Duncan).

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, ratas das linhagens SHR e SLA16 foram utilizados para avaliação da influência da microbiota intestinal na pressão arterial e comportamento. Para tanto, as análises foram divididas em três blocos experimentais. O primeiro bloco experimental buscou caracterizar a influência do ciclo estral de ratas de ambas as linhagens na PAS e comportamento no CA, que poderiam atuar como fator de confusão nos experimentos subsequentes. O segundo bloco focou em avaliar os efeitos sobre a PAS e comportamento nas linhagens após modificações em relação a sua microbiota, através da administração de um coquetel de antibióticos. E, o terceiro bloco, por sua vez, avaliou o transplante da microbiota fecal (TMF), sobre índices experimentais de PAS e comportamento.

### 6.1. PRIMEIRO BLOCO EXPERIMENTAL

O ciclo estral, ou ciclo reprodutivo regular de roedores, tem duração média de quatro ou cinco dias (FREEMAN, 1988; BIANCHI et al., 2001) e é caracterizado por quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro (FREEMAN, 1988). O ciclo desses animais, quando regular, tem atuação máxima de estradiol, LH e FSH na fase de proestro, e pico de progesterona no final da fase do proestro e início do estro, retornando a valores basais durante o metaestro e diestro (GOLDMAN et al., 2007). Como já evidenciado na literatura, a linhagem SHR apresenta alterações neuroendócrinas e reprodutoras importantes, devido a diminuição dos níveis de LH no soro durante a fase do proestro (HASHIMOTO et al., 1989); o menor número de ovulações por ciclo; redução nas taxas de gravidez bem sucedidas (PINILLA et al., 1992); menor tamanho da ninhada; além da redução da sobrevivência após o nascimento (PINILLA et al., 1992; MCCARTY et al., 1978; LORENZ et al., 1984).

Nesse contexto, no presente trabalho a linhagem SHR apresentou um leve aumento da duração total do ciclo e de suas fases em comparação a média regular em roedores descrita na literatura (FREEMAN et al., 1988). Enquanto que, a linhagem SLA16 apresentou a diminuição das fases de diestro e estro, que se refletiram na duração total. Apesar disso, ambas as linhagens apresentam uma alta regularidade do ciclo estral.

A posterior análise sobre efeitos do ciclo estral nos parâmetros de PAS de ambas as linhagens, foi realizada utilizando a técnica de pletismografia de cauda, conhecido por não ser invasivo e não necessitar de métodos cirúrgicos (KURTZ, et al., 2005). Esse conjunto de dados demonstrou que a comparação basal entre as linhagens demonstra ratos SHR com maiores níveis de PAS em comparação aos SLA16. Em acordo com esses dados, ratos machos SHR e SLA16, com quatro e seis meses, apresentam o mesmo perfil de efeito (CORRÊA, 2015). Que pode ser evidenciado também por Dos Anjos (2017), que demonstrou diferença de linhagem (SHR/SLA16) em ratas fêmeas com dois meses pelo método invasivo, mas o mesmo não se mostrou reprodutível pelo método de pletismografia de cauda. Dessa forma, apesar da aferição dos níveis pressóricos por pletismógrafo ter como desvantagens processos de interferência nas análises, como o estresse ocasionado pela insuflação do manguito, o acondicionamento dos animais no contensor e o próprio aquecimento da cauda para maior dilatação da veia caudal (ZHAO et al., 2011), o fator idade parece ser importante para o aparecimento das diferenças basais de PAS entre ratas das duas linhagens.

O ciclo estral, por sua vez, não demonstrou interferências na PAS de ambas as linhagens o que corrobora com dados encontrados por Eikelis e colaboradores (2000), que demonstraram não haver diferença de pressão arterial em ratas SHR durante as fases diestro e não diestro. Junto a isso, ratas SHR ovariectomizadas não apresentam modificações no desenvolvimento de sua hipertensão (RECKELHOFF et al., 1999). Apesar desses resultados, outros estudos demonstram que os efeitos de hormônios, como preparações estrogênicas em relação à pressão arterial são inconsistentes, pois incluem relatos de redução da pressão arterial (SZEKACS et al., 2000; SORENSEN et al., 2000), elevação da pressão arterial (UTIAN, 1978), ou ausência de efeitos (MILLER et al., 1995; PRIPP et al., 1999). Outros estudos demonstram que contraceptivos orais contendo estrogênio induzem um aumento na pressão sanguínea de mulheres, perfil esse também evidenciado em ratos (WOODS et al., 1967; FOWLER JR et al., 1985; TAKEZAWA et al., 1994) demonstrando que os efeitos de estrogênios naturais e sintéticos diferem, podendo influenciar mecanismos distintos envolvidos na regulação da pressão.

Dessa forma, os parâmetros avaliados no presente estudo são importantes, tanto para uma caracterização das linhagens SHR e SLA16, quanto para descartar o possível impacto do ciclo estral nas análises subsequentes do presente trabalho

(pertencentes ao segundo e terceiro bloco experimentais, que buscam avaliar a influência da microbiota nas diferenças de PAS das linhagens).

Em sequência, buscou-se avaliar a influência do ciclo estral em parâmetros comportamentais do teste do CA. O aparato consiste na exposição dos animais a um ambiente grande e aberto que contradiz com a situação natural da espécie e o confronto entre seguir um instinto exploratório, ou de cautela. Por essa razão, gera mudanças emocionais que são mensuradas através de parâmetros comportamentais (PRUT & BELZUNG, 2003; WALSH & CUMMINS, 1976). Nesse contexto, a tendência dos animais no teste do CA é de se locomoverem próximos às paredes, de maneira que as visitas à área central do aparato, bem como o tempo gasto no centro, podem ser relacionadas a um tipo de comportamento “menos ansioso” (PRUT & BELZUNG, 2003). Sabe-se ainda que as linhagens SHR e SLA16 tendem a sustentar alta exploração do CA por longo período de tempo e não mostram habituação quando expostas ao aparato em dias consecutivos (GRANZOTTO, 2016), o que possibilitou as repetições das análises nesse trabalho durante as fases do ciclo estral.

Dados obtidos na avaliação do CA demonstram efeitos para o fator linhagem com aumentos dos escores de SLA16 frente aos parâmetros de locomoção (total, central e parcial) como já evidenciado em estudos anteriores do nosso grupo (ANSELMINI et al., 2016; DE MEDEIROS et al., 2013; FADANNI, 2018; GRANZOTTO, 2016; PÉRTILE et al., 2017). Além disso, foi possível observar que as diferenças apresentadas entre as linhagens são independentes da fase do ciclo estral na qual as fêmeas se encontram, o que corrobora com dados publicados por De Medeiros (2012), que demonstrou os mesmos resultados vistos após administração de estradiol e progesterona (a fim de sincronizar o ciclo hormonal dos animais) nas linhagens SHR e SLA16. De forma contrária, Izídio e colaboradores (2011) sugeriram que as variações hormonais das fêmeas ao longo do ciclo estral poderiam alterar os seus níveis de entradas no centro do CA. Apesar disso, no presente estudo esses efeitos não foram visíveis.

No conjunto total, os dados neste primeiro bloco experimental descartam possíveis interferências do ciclo estral uma vez que as diferenças de PAS, assim como de comportamento no CA, entre as linhagens, não são dependentes das fases do ciclo estral das fêmeas.

## 6.2. SEGUNDO BLOCO EXPERIMENTAL

Como já mencionado, dentro do leque de modelos experimentais para o estudo da microbiota há a utilização de antibióticos de amplo espectro com a finalidade de induzir alterações transitórias na composição e na diversidade da microbiota fecal, apresentando-se como uma abordagem alternativa para o uso de modelos animais *germ free* (BERCIK et al., 2011). Embora os efeitos dos antibióticos sobre as comunidades microbianas sejam bem compreendidos, eles também podem interagir diretamente com a fisiologia do hospedeiro em mecanismos independentes da microbiota, tais como seus efeitos neurotóxicos ou neuroprotetores (GRILL et al., 2011; SHARMA et al., 2019). No entanto, o uso de antibióticos de amplo espectro, como modelo, permanece uma ferramenta poderosa para identificar a influência microbiana intestinal sobre diferentes sistemas, visto que muitos efeitos bioquímicos e comportamentais são semelhantes entre os modelos experimentais, podendo então, ser associado com alterações no perfil microbiano (BERCIK et al., 2011).

Por essas razões, o segundo bloco experimental deste trabalho teve como um de seus objetivos avaliar os efeitos da administração de antibióticos de amplo espectro sob a PAS e comportamento das linhagens SHR e SLA16. Nesse contexto, ratos SHR e SLA16 diferiram em respostas de PAS, além de também serem encontradas alterações comportamentais induzidas pelos antibióticos utilizados.

O coquetel de antibiótico utilizado apresenta em combinação, atividades antibacterianas contra um amplo espectro de bactérias, como as Gram positivas (ampicilina e vancomicina), as Gram negativas (ampicilina e neomicina) (KOLLEF, 2005) além da anfotericina B que atua suprimindo o crescimento fúngico.

Com isso, a administração do coquetel de antibióticos resultou em uma diminuição da PAS em ratos SHR já a partir da primeira semana de tratamento, sem causar alterações significativas sob a linhagem SLA16. Esse perfil de resultados divergentes entre linhagens isogênicas de animais sob a influência de antibióticos já foram evidenciados em estudos anteriores, nos quais a administração de minociclina, neomicina e vancomicina, administradas isoladamente, induzem um aumento da PAS em ratos Dahl sensíveis ao sal. Enquanto que, o mesmo estudo demonstra que minociclina e vancomicina induzem a diminuição da PAS de ratos SHR (GALLA et al, 2018), sugerindo que, assim como a composição da microbiota, as diferenças genéticas também podem influenciar o efeito dos antibióticos sobre a PAS. No

presente bloco experimental também foi observado um efeito fator linhagem, no qual as ratas SHR apresentam níveis de PAS aumentados em relação às SLA16, assim como no primeiro bloco.

Concomitante a isso, trabalhos anteriores demonstraram que alguns antibióticos além dos efeitos antibacterianos, possuem também efeitos anti-inflamatórios. Dessa forma, a administração de tetraciclina modificada (que apresenta exclusivamente propriedades anti-inflamatórias) em ratos hipertensos com infusão de angiotensina II, acarreta melhora da disbiose e redução da PAS. Esse efeito foi visível junto à diminuição da ativação microglial e também na diminuição da neuroinflamação (SHARMA et al., 2019; SHI et al, 2010), apoiando a hipótese de que uma disfunção do eixo cérebro-intestino-microbiota pode ter um efeito sobre a resposta autonômica na regulação da hipertensão.

Outra ligação potencial para esses efeitos, pode envolver alguns metabólitos bacterianos. Dessa forma, além da microbiota intestinal poder gerar substâncias vasoativas incluindo dopamina, noradrenalina e serotonina (AFSAR et al., 2016), ela pode produzir ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) a partir da fermentação da fibra alimentar. Em conjunto, o acetato, o propionato e o butirato representam 80% dos AGCCs produzidos pela microbiota. Os AGCCs têm sido implicados como principais moléculas de sinalização, mediando a comunicação microbiota-hospedeiro, tendo ainda, um papel importante devido a suas propriedades anti-inflamatórias e imunes através da ligação aos receptores da proteína G, causando vasodilatação *in vitro* e hipotensão *in vivo* em modelos animais (MARQUES et al., 2018).

Dentre estes ácidos graxos, já foi demonstrado que o propionato e o acetato agem sobre o receptor olfatório (olfr78) expresso em neurônios olfativos e em células musculares lisas dos vasos renais. Essa interação resulta na redução da pressão arterial, devido ao controle da taxa de filtração glomerular e na liberação de renina (PLUZNICK et al., 2013). Além disso, há três outros receptores de proteína G envolvidos: Gpr41 acoplado a proteína G inibitória (Gi), expresso ao longo do intestino delgado, cólon e principalmente no tecido adiposo; Gpr43 (acoplado a proteína Gi e/ou Gq e encontrados nas células imunológicas; e o Gpr109a, que apesar de ainda não ser tão bem esclarecido, já foi sugerido por responder a ativação do butirato e auxiliar na regulação da pressão arterial por indução da vasodilatação (PEVSNER-FISCHER et al., 2017; BROWN et al., 2003). Além disso, o butirato apresenta efeitos benéficos quando usado pelos colonócitos para manutenção da barreira intestinal e diminuição

da inflamação local (MARQUES et al., 2018). Curiosamente, os níveis de acetato e butirato produzidos são diminuídos em modelos animais de hipertensão como o SHR (YANG et al., 2015), enquanto que outros metabólitos bacterianos, como o lactato, apresentam-se em níveis aumentados em modelos animais, assim como em humanos hipertensos, por estar associados a um quadro de angiogênese insuficiente e diminuição da capacidade oxidativa, fatores esses, que podem servir como marcadores de uma diminuição da capacidade vascular que conduz ao aumento da PAS (JURASCHEK et al., 2014). Assim, após as análises de PAS, o efeito da administração de antibióticos sobre o comportamento dos animais foi avaliado frente aos aparatos de CA, CATiv e LCE.

Os comportamentos avaliados no CA dependem não só da emocionalidade como também da locomoção e por essa razão, não é possível ao experimentador separar tais fatores (RAMOS, 2008). Decorrente a isso, a influência da administração de antibióticos foi também avaliada frente à CATiv que apresenta menor tamanho e aversividade quando comparado ao CA, sendo assim melhor empregada na avaliação do perfil locomotor.

Dessa forma, assim como no primeiro bloco experimental, foram encontradas diferenças entre as linhagens para todos os parâmetros no CA, exceto tempo no centro. Esse efeito já foi previamente demonstrado em diversos outros trabalhos do grupo e é, sem dúvida, a diferença mais robusta e reproduzida ao longo dos últimos anos (ANSELMINI et al., 2016; DE MEDEIROS et al., 2013; FADANNI, 2018; GRANZOTTO, 2016; PÉRTILE et al., 2017). Em paralelo a isso, a análise da atividade locomotora na CATiv demonstrou que a linhagem SLA16 apresentou maiores níveis de locomoção em relação a sua linhagem parental SHR, perfil esse que se torna evidente durante os trinta minutos iniciais de teste, porém sem sustentação após esse período.

Dados prévios do grupo em uma tentativa de compreender e interpretar as diferenças locomotoras entre as duas linhagens, já demonstraram que essa diferença é maior durante os primeiros minutos de teste, estando associado a um fator novidade no teste em questão (DE MEDEIROS et al., 2013; ANSELMINI et al., 2016). Com isso, o decréscimo dessa diferença locomotora após a habituação ao novo ambiente, sugere que o RGD modula, de fato, a reatividade ao estresse e não a atividade motora espontânea em si (DE MEDEIROS, 2012). Junto a essas análises, ambas as linhagens SHR e SLA16 apresentaram um menor comportamento locomotor após

receberem sucessivas doses de antibióticos, visto isto tanto no CA quanto durante os trinta minutos iniciais na CAtiv. Levando então à discussão se esse efeito, visto principalmente nos instantes iniciais de análise, não poderia estar associado à diminuição dessa hiperatividade frente à novidade, resultando nessa redução da ambulação sem a necessidade de prejuízos ao desempenho motor.

Em paralelo, outro estudo demonstra que a administração de um coquetel de antibióticos (neomicina, metronidazol e polimixina B) em fêmeas resulta na redução da atividade locomotora no CA junto a alterações na composição da microbiota intestinal devido a redução do filo Firmicutes e consequente aumento de Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria. Indicando assim, que os antibióticos podem exercer sua ação via eixo-cérebro-intestino-microbiota (DAVERY et al., 2013). Em contraste, esses efeitos não são encontrados em animais *germ free*, que apresentam aumento da atividade locomotora total frente ao CA (NISHINO et al., 2013; HEIJTZ et al., 2011) e que apesar de apresentar esse aumento da locomoção total, os camundongos *germ free* e SPF exibem atividade locomotora semelhante durante a exposição inicial ao aparato. Este fenótipo indica que o posterior aumento da atividade locomotora em camundongos *germ free* não é provocado pela novidade, mas sim pela habituação ao longo do tempo (HEIJTZ et al., 2011).

No LCE os animais são expostos a um conflito, de certa forma, semelhante ao do CA entre a exploração e estímulos com relevância aversiva. Por consequência, devido a estrutura do aparato, os animais tendem a evitar os braços abertos e exibir comportamentos como a avaliação de risco (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005). Dessa forma, o tempo/esforço do animal investido em uma variedade de parâmetros é geralmente usado para avaliar efeitos de fármacos sobre comportamentos relacionados à ansiedade (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005). Para tanto, foi encontrada um efeito para o fator linhagem com aumento do número de entradas nos braços abertos (medida essa, que se enquadra em fatores relacionados tanto a locomoção quanto a ansiedade) e entradas nos braços fechados para a linhagem SLA16 (parâmetro a qual se enquadra exclusivamente no fator relacionado à locomoção, como já descrito em outros estudos) (PELLOW et al., 1985; CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995). Apesar disso, o tratamento com antibiótico demonstrou, em ambas as linhagens, um efeito ansiolítico caracterizado pelo aumento do número de entradas nos braços abertos dos animais tratados.



Esses resultados suportam a ideia de que os efeitos encontrados sobre a locomoção no CA e na CAtiv não estão associados aos prejuízos motores, mas sim ao fator emocional. Alguns estudos já demonstram efeitos semelhantes em animais *germ free* com redução do comportamento ansioso quando avaliados no labirinto em cruz elevado e caixa branca e preta, resultados esses, que mostram o aumento da exploração de zonas tipicamente aversivas dos aparatos (HEIJTZ et al., 2011; NEUFELD et al., 2011; CLARKE et al, 2012). Concomitante a isso, o tratamento com coquetel de antibióticos em animais SPF e *germ free*, mostram redução do comportamento ansioso em camundongos SPF, mas sem efeitos sobre o comportamento de camundongos *germ free*, apoiando a conclusão de que as mudanças comportamentais são mediadas por alterações na microbiota, e não por interação indireta dessa classe de fármacos na fisiologia do hospedeiro.

Novamente, a literatura demonstra que esses efeitos decorrentes de uma comunicação eixo-cérebro-intestino-microbiota, pode ser mediada por várias moléculas microbianas que incluem os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), ácidos biliares secundários e metabólitos do triptofano. Essas moléculas propagam sinais principalmente através da interação com CEEs, CECs e o sistema imunológico da mucosa (TOPPING et al., 2001). Dessa forma, algumas destas substâncias podem atravessar a barreira intestinal entrando na circulação sistêmica, sendo assim, possibilitam também a passagem delas pela barreira hematoencefálica (HAGHIKIA et al, 2015). Vários estudos têm localizado receptores GPR41 em gânglios e neurônios sugerindo uma ativação neuronal pela microbiota derivado dos AGCCs. A ativação de GPR41 em neurônios possibilita a liberação de noradrenalina, que estabelece uma interface funcional direta de derivados microbianos com o sistema nervoso simpático (KIMURA et al., 2011). Já é de conhecimento também que animais *germ free* apresentam baixas concentrações AGCCs, no conteúdo intestinal em comparação com animais SPF (HOVERSTAD e MIDTVEDT, 1986). Dessa forma, reforça-se a importância da mensuração desses metabólitos envolvidos tanto em aspectos cardiovasculares como neurobiológicos.

Além disso, como já descrito, algumas espécies bacterianas estão envolvidas na estimulação da produção de neurotransmissores. Um destes, é a serotonina. Uma análise do perfil desta amina no plasma de animais *germ free* mostra uma diminuição considerável dos seus níveis em relação aos animais que apresentam uma microbiota convencional (WIKOFF et al., 2009). Junto a isso, animais *germ free* demonstram

também níveis aumentados de triptofano (aminoácido essencial precursor da serotonina) no plasma, aspecto esse que pode ser normalizado após restabelecimento da microbiota (CLARKE et al., 2013). Embora os mecanismos exatos de regulação dos níveis periféricos do triptofano sejam desconhecidos, o mesmo estudo sugere também que a microbiota modula a degradação de triptofano através da via da quinurenina, sendo que, nos últimos anos, essa via vem ganhando destaque como um importante regulador da produção de agentes neuroprotetores e neurotóxicos em diferentes tecidos (MÜLLER et al., 2017).

Após o período de tratamento, os cultivos bacterianos de fezes de animais controles e tratados demonstrou que o tratamento em questão é eficiente para a diminuição da microbiota intestinal em termos de microrganismos cultiváveis. Esses resultados corroboram com os dados demonstrados por Reikvan e colaboradores (2011), onde o mesmo protocolo de tratamento induziu uma redução de 74% do crescimento bacteriano. Evidências sugerem ainda, que o uso de antibióticos causa uma disbiose intestinal, que conduz à disseminação de bactérias multirresistentes derivadas da microbiota o que pode, como já demonstrado resultar no desenvolvimento e agravamento de doenças (AYRES et al., 2012; UBEDA et al., 2010; KNOOP et al., 2016).

Para tanto, foi possível realizar a identificações de alguns microrganismos, que se demonstraram resistentes ao tratamento, a partir do isolamento por cultivo bacteriano. Destes, a bactéria *Enterococcus faecalis*, pertencente ao filo Firmicutes, já apresenta evidências na literatura sobre efeitos na regulação da pressão arterial, pois, alguns estudos demonstram que o leite fermentado com cepas de *Enterococcus faecalis* é capaz de produzir produtos fermentados (peptídeos) com potente atividade inibidora da enzima conversora da angiotensina (IECA) e subsequente atividade anti-hipertensiva em ratos SHR (MUGUERZA et al., 2005; MIGUEL et al., 2006; QUIRÓZ et al., 2007).

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um fator chave na manutenção da pressão arterial e um dos principais componentes deste sistema é enzima de conversão da angiotensina (ECA) (ONDETTI et al., 1977) que catalisa a conversão de angiotensina I, um peptídeo inativo, em angiotensina II, um peptídeo com potente ação vasoconstritora (SKEGGS et al., 1956) ao atuar em receptores para angiotensina do tipo I e II (AT1 e AT2) (FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008). Além disso, a ECA catalisa a inativação de bradicinina, que possui importante atividade de vasodilatação.

Portanto, a ECA tem um papel importante na regulação da pressão arterial e a inibição desta enzima pode gerar um efeito anti-hipertensivo. Além disso, já foi evidenciado em estudos anteriores do nosso grupo, que a inativação do SRA pela losartana potássica, conhecida por ser um fármaco antagonista para os receptores AT1, é capaz de induzir resposta nas linhagens SHR e SLA16 com uma redução da PAS (DOS ANJOS, 2017). Diante disso, como já mencionado a bactéria *Enterococcus faecalis* contribui na regulação desse sistema, o que a torna importante para o perfil de redução da pressão arterial de ratos SHR ao fim da antibioticoterapia. Apesar disso, a bactéria em questão foi encontrada em ambas as linhagens, e como mencionado, os efeitos pressóricos foram divergentes.

Dessa forma, ao observar outras bactérias isoladas em amostras de ratos SLA16, há a *Enterococcus galinarum*. Estudos recentes vêm demonstrando que um dos mecanismos propostos como importantes para o desenvolvimento da pressão arterial elevada é decorrente de alterações do sistema imunológico destes animais, em que se observa a ativação de células T no intestino e o acúmulo de células Th17 e interleucina-17 (IL-17) no tecido vascular. Esse perfil imune acarreta um aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) e posterior lesão endotelial. A composição da microbiota foi considerada um fator chave para essa modulação do sistema imune (TORAL et al., 2019). A qual, bactérias comensais como a *Enterococcus galinarum*, podem produzir substâncias como adenosina trifosfato (ATP) que estimula as células dendríticas residentes a produzir interleucina 6 (IL-6) e fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), duas citocinas necessárias para a expansão das células Th17 (ATARASHI et al., 2008; IWASE et al., 2010). Contrário a isso, mas reforçando esses mecanismos, já há estudos relacionados com a manipulação da microbiota através do seu enriquecimento com outra bactéria, *Lactobacillus murinus*, demonstrando que essa bactéria conseguiu reduzir a hipertensão induzida por dieta rica em sal através da diminuição das células Th17 intestinais (WILCK et al., 2017). Dessa forma, esse conjunto de dados sugere que a composição da microbiota é um fator importante para a ativação de células Th17 e o desenvolvimento da hipertensão.

Além disso, em relação ao *Clostridioides spp.*, apesar da ampla gama de espécies existentes no gênero, já é de conhecimento que elas podem causar infecções graves e rapidamente fatais, normalmente como resultado de um quadro de toxemia. O impacto destas toxinas letais no hospedeiro são variadas e complexas e já se sabe, a partir de estudos realizados por Sakurai e colaboradores (1981) que a

toxina beta (produzidas por bactérias do gênero *Clostridioides*), quando administrada por via intraperitoneal em ratos, acarreta alterações de vários parâmetros fisiológicos, incluindo o aumento da pressão arterial e diminuição da frequência cardíaca. Sakurai e colaboradores (1984) mostraram que, esse aumento da pressão arterial pode ser substancialmente reduzido em ratos tratados com guanetidina (anti-hipertensivo que atua inibindo seletivamente a neurotransmissão adrenérgica), sugerindo que essa toxina pode apresentar um efeito direto sobre o sistema nervoso autônomo. Apesar desses estudos serem importantes para auxiliar na compreensão do papel dessas bactérias junto ao surgimento de alterações na PAS encontradas em nossas linhagens, pouco se sabe ainda sobre os seus efeitos em aspectos comportamentais.

### 6.3. TERCEIRO BLOCO EXPERIMENTAL

Nesse contexto, sabendo que diferentes patógenos presentes na microbiota podem levar a ações divergentes entre si e que a sua presença em cada organismo pode ser variada, foi hipotetizado que os fenômenos observados entre as duas linhagens, poderiam ser modulados ao realizar a troca da microbiota entre os animais. Atualmente o TMF se tornou mais uma ferramenta de estudo e já se demonstra eficaz na clínica, sendo cada vez mais utilizado no tratamento de pacientes com infecção por *Clostridioides difficile* recorrente, apesar disso, seu uso em pacientes ainda se apresenta controverso (MA et al., 2017). Devido a isto, os principais usos da técnica se dão a partir de modelos animais com o intuito de investigar a relação da microbiota intestinal com o desenvolvimento de patologias. Para início das análises a partir do TMF, o processo de cultivo bacteriano de fezes foi utilizado novamente para avaliação do perfil quantitativo da microbiota intestinal ao décimo sétimo dia, evidenciando que a recolonização da microbiota se deu após 3 dias de tratamento com solução fecal possibilitando assim a continuidade dos testes propostos.

Para a fase de avaliação da PAS, ratos SLA16 que receberam material fecal proveniente de animais SHR apresentaram um aumento dos níveis de PAS. De acordo com esses dados, outros estudos demonstraram que o transplante de material fecal de ratos *Stroke-Prone* SHRs (SHRSP) em ratos WKY, tratados previamente com antibióticos, conduziu a um aumento da PAS ao passo que as amostras fecais de ratos WKY transplantados para SHRSP reduziu PAS (embora não de forma significativa). (ADNAN et al., 2017; DURGAN, et al., 2016). Além disso, os ratos WKY

transplantados com fezes de SHRSP apresentaram um aumento da relação Firmicutes/Bacteroidetes em comparação com ratos WKY controles (ADNAN et al., 2017).

Notavelmente, a literatura já demonstra que ratos jovens SHR (pré-hipertensos) não apresentam alterações na microbiota intestinal ou na relação Firmicutes/Bacteroidetes em comparação com ratos WKY da mesma idade, o qual dá suporte à hipótese de que o desenvolvimento de uma disbiose intestinal coincide com o aumento da pressão arterial (SANTISTEBAN et al., 2017). Combinados aos resultados aqui encontrados, estes estudos suportam o preceito de que a microbiota intestinal é essencial para o desenvolvimento de hipertensão e que a disbiose intestinal não é meramente uma consequência do aumento da pressão arterial, mas uma causa direta.

Em sequência, foram realizadas as análises comportamentais frente ao CA. Os resultados demonstraram os mesmos efeitos para o fator linhagem já apresentados anteriormente, com maiores scores dos parâmetros de entradas no centro e locomoção total, central e periférica para a linhagem SLA16. Além disso, houve a normalização do perfil locomotor após a recolonização da microbiota intestinal através do TMF, independente da troca gerada. Para essa análise, o TMF apresentou-se somente efetivo sob a linhagem SLA16 no parâmetro entradas no centro do CA, em que o tratamento acarreta uma diminuição da exploração dessa área aversiva, apresentando um perfil semelhante ao SHR. Esses resultados poderiam indicar que o transplante acarretou em um efeito ansiogênico sobre a linhagem SLA16, mas esses dados não foram reproduzidos nas análises do LCE, onde apesar de ser encontrado efeito para o fator linhagem em relação às entradas nos braços abertos, os efeitos para tratamento com TMF não foram evidentes.

Ou seja, na presente análise a recuperação da microbiota (independente de quem ela pertença) leva ao restabelecimento do comportamento padrão de ratos SHR e SLA16 frente ao aparato. Curiosamente, quando animais *germ free* sofrem recolonização por microbiota de ratos SPF, observa-se um comportamento tipo ansioso semelhante ao visto no CA, o que, apesar de não ser evidente no LCE pode reforçar esse fenótipo comportamental (BERCIK et al., 2011).

Em última análise, os animais utilizados nos experimentos do segundo e terceiro bloco experimental, durante as duas fases de tratamento (antibiótico e TMF) tiveram a massa corporal acompanhada através de pesagem, que apresentou uma

redução transiente no dia 5 após a introdução da terapia antibacteriana. Esse resultado corrobora com Reikvan e colaboradores (2011), que sugerem que essa perda de peso é associada ao ajuste da ampicilina na água do bebedouro, devido o mesmo perfil de perda de massa corporal ter sido demonstrado após a sua terapia isolada. Apesar dessa perda branda de peso específica, posteriormente os animais apresentaram recuperação sem nenhum sinal de desconforto, permanecendo assim até o fim do transplante fecal. Esses efeitos observados são importantes em dois aspectos: 1) demonstrar que o protocolo utilizado foi reproduzível nas linhagens aqui estudadas devido aos níveis deletérios da microbiota e efeitos sobre a massa corporal dos animais apresentarem-se semelhantes a literatura; 2) demonstrar que a escolha desse protocolo não causa prejuízos visíveis a saúde do animal, uma vez que dados não publicados do laboratório demonstram que ambas as linhagens, SHR e SLA16 são sensíveis à dose de 50mg/Kg de ciprofloxacina, via intraperitoneal, causando visível dor e desconforto. E por outros estudos já demonstrarem abordagens que utilizam diferentes vias de administração que podem causar prejuízo à saúde do animal (REIKVAN, et al., 2011).

## 7. CONCLUSÕES

De acordo com os dados apresentados neste trabalho, mostrou-se que o ciclo estral de ratas SHR e SLA16 não impacta significativamente os parâmetros de PAS e comportamento frente ao CA. Descarta-se assim, possíveis interferências do ciclo estral, uma vez que as diferenças entre linhagens na PAS, assim como comportamento tipo-ansioso e atividade locomotora no CA, não são dependentes das fases do ciclo estral das fêmeas.

Além disso, neste trabalho testou-se a hipótese de que a microbiota intestinal dos animais SHR e SLA16 seria responsável pelas diferenças de PAS e comportamentais encontradas entre as linhagens. Essa hipótese foi parcialmente aceita, visto que os principais achados refletem essa relação com a PAS, mas não de forma tão evidente nos aspectos comportamentais após o TMF.

Em conclusão, demonstramos a importância de uma microbiota íntegra para a regulação da PAS e parâmetros comportamentais. Em contraste, o efeito no TMF sugere que as microbiotas de SHR e SLA16 estão mais relacionadas à regulação das diferenças de pressão arterial apresentadas pelas linhagens. Por fim, sugerimos estudos futuros utilizando análises de metabólitos produzidos a partir dessa microbiota que podem estar envolvidos nos mecanismos para o aparecimento dos fenótipos aqui evidenciados, e abordagens experimentais com as bactérias identificadas nesse estudo, em especial a *Enterococcus faecalis* que se demonstra promissora principalmente em relação à regulação da pressão arterial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFSAR, Baris et al. Gut hormones and gut microbiota: implications for kidney function and hypertension. **Journal of the American Society of Hypertension**, Konya, v. 10, n. 12, p. 954-961, dez. 2016.

AITMAN, Timothy et al. Progress and prospects in rat genetics: a community view. **Nature genetics**, Missouri, v. 40, n. 5, p. 516, mai. 2008.

ADNAN, Sareema et al. Alterations in the gut microbiota can elicit hypertension in rats. **Physiological genomics**, Houston, v. 49, n. 2, p. 96-104, dez. 2016.

ANSELMINI, Mayara et al. Genetic evidence for chromosome 4 loci influencing learning and memory. **Neurobiology of learning and memory**, Florianópolis, v. 131, p. 182-191, mai. 2016.

ATARASHI, Koji et al. ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation. **Nature**, Osaka, v. 455, n. 7214, p. 808, out. 2008.

AYRES, J.S.; TRINIDAD, N.J.; VANCE, R.E. Lethal inflammasome activation by a multidrug-resistant pathobiont upon antibiotic disruption of the microbiota. **Nature Medicine**, v. 18, p. 799–806, 2012

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

BERCIK Premysl. et al. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotrophic factor and behavior in mice. **Gastroenterology**, Ontario, v. 141, p. 599–609, ago, 2011.

BERGER, Miles; GRAY, John; ROTH, Bryan. The expanded biology of serotonin. **Annual review of medicine**, California, v. 60, p. 355-366, 2009.

BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P.; MARCONDES, F.K. Relação entre nível de estresse e supersensibilidade à norepinefrina em ratas no proestro. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, p. 391–398, 2001.

BORODOVITSYNA, Olga; FLAMINI, Matthew; CHANDLER, Daniel. Noradrenergic modulation of cognition in health and disease. **Neural plasticity**, Stratford, v. 2017, mai. 2017.

BROWN, Andrew et al. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. **Journal of Biological Chemistry**, Hertfordshire, v. 278, n. 13, p. 11312-11319, dez. 2003.

BRZOZOWSKI, Bartosz et al. Mechanisms by which stress affects the experimental and clinical inflammatory bowel disease (IBD): role of brain-gut axis. **Current neuropharmacology**, v. 14, n. 8, p. 892-900, nov. 2016.



CAHILL, Larry. Why sex matters for neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, California, v. 7, n. 6, p. 477, mai. 2006.

CAMBOTTI, Lisa et al. Neonatal gonadal hormones and blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 247, n. 2, p. E258-E264, ago. 1984.

CAROBREZ, A.P.; L.J. BERTOGLIO. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1193-1205, 2005.

CHEN, Chien-Chang; WALKER, Allan. Probiotics and prebiotics: role in clinical disease states. **Advances in pediatrics**, Taoyuan, v. 52, p. 77-113, 2005.

CLARKE, Gerard. et al. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. **Molecular psychiatry**, Cork, v. 18, n. 6, p. 666, jun. 2013.

CORRÊA, F. J. O cromossomo 4 influencia comportamentos relacionados à memória em um modelo genético de ratos, 2015. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

CRUZ, A.P.M.; FREI, F.; GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, Ribeirão Preto, v. 49, n. 1, p. 171-176, set. 1994.

DAVERY, K. et al. Antipsychotics and the gut microbiome: olanzapine-induced metabolic dysfunction is attenuated by antibiotic administration in the rat. **Translational psychiatry**, v. 3, n. 10, 2013.

DE MEDEIROS, Gabriela Fernandes, Caracterização fenotípica e molecular da linhagem congênica de ratos SHR.LEW-Anxrr16 como um novo modelo genético para o estudo da ansiedade. 2012. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2012

DE MEDEIROS, Gabriela Ferreira et al. Low-Anxiety Rat Phenotypes Can Be Further Reduced through Genetic Intervention. **Plos One**, Florianópolis, v. 8, n. 12, p. 1-12, 2013.

DIAZ P., et al. Utility of cyto centrifugation in the microscopic bacterial diagnosis of body fluids. **Revista chilena de infectología**, v. 19, n. 3, p.167-173, 2002.

DOS ANJOS, P.A.R. Fêmeas das linhagens SHR e SLA16: um modelo genético para o estudo dos efeitos do etanol. 2017. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2019

DURGAN, David et al. Role of the gut microbiome in obstructive sleep apnea-induced hypertension. **Hypertension**, Texas, v. 67, p. 469–474, dez. 2016.

EIKELIS, Nina; VAN DEN BUUSE, Maarten. Cardiovascular responses to open-field stress in rats: sex differences and effects of gonadal hormones. **Stress**, Prahran, v. 3, n. 4, p. 319-334, nov. 2000.

ERNY, Daniel et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. **Nature neuroscience**, Freiburg, v. 18, n. 7, p. 965, jun. 2015.

FADANNI, Guilherme Pasetto. Efeitos comportamentais e neuroquímicos induzidos pela injeção bilateral de 6-hidroxidopamina no estriado de ratos das linhagens SHR e SLA16. 2018. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2018.

FORSYTHE, Paul; BIENENSTOCK, John; KUNZE, Wolfgang A. Vagal pathways for microbiome-brain-gut axis communication. In: **Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease**. Springer, New York, NY, 2014. p. 115-133.

FOWLER JR, WAYNE L. et al. Renin-angiotensin mechanisms in oral contraceptive hypertension in conscious rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 248, n. 5, p. H695-H699, mai. 1985.

FREEMAN, M.E. The ovarian cycle of the rat. E. KNOBIL and J. NEIL. (eds). In: **Physiology of reproduction**, New York: Raven Press Ltd, p. 1893-1928, 1988.

FYHRQUIST, Frej; SAIJONMAA, Outi. Renin-angiotensin system revisited. **Journal of internal medicine**, Helsinki, v. 264, n. 3, p. 224-236, ago. 2008.

GALLA, Sarah et al. Disparate effects of antibiotics on hypertension. **Physiological genomics**, Toledo, v. 50, n. 10, p. 837-845, ago. 2018.

GENSOLLEN, Thomas et al. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. **Science**, Boston, v. 352, n. 6285, p. 539-544, abr. 2016.

GOLDMAN, J.M.; MURR, A.S.; COOPER, R.L. The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 80, n. 2, p. 84-97, 2007.

GÓMEZ-GUZMÁN, Manuel et al. Antihypertensive effects of probiotics Lactobacillus strains in spontaneously hypertensive rats. **Molecular nutrition & food research**, Granada, v. 59, n. 11, p. 2326-2336, jul. 2015.

GRANZOTTO, Natalli. Efeitos farmacogenéticos do tratamento com cafeína em ratos isogênicos SHR e SLA16. 2016. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2016.

GRILL M.F.; MAGANTI R.K. Neurotoxic effects associated with antibiotic use: management considerations. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 72, p. 381–393, 2011.

HAGHIKIA, Aiden et al. Dietary fatty acids directly impact central nervous system autoimmunity via the small intestine. **Immunity**, Bochum, v. 43, n. 4, p. 817-829, out. 2015.

HALL, Calvin. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative psychology**, v. 18, n. 3, p. 385, 1934.

HASHIMOTO, Ryuhei; KIMURA, Fukuko. Puberty and ovulatory release of gonadotropins in spontaneously hypertensive rats. **Endocrinologia japonica**, Yokohama, v. 36, n. 5, p. 675-680, out. 1989.

HEIJTZ, R.D. et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 3047–3052, 2011.

HOVERSTAD, Torgeir; MIDTVEDT, Tore. Short-chain fatty acids in germfree mice and rats. **The Journal of nutrition**, v. 116, n. 9, p. 1772-1776, set. 1986.

IZÍDIO, Geison de Souza et al. The influence of sex and estrous cycle on QTL for emotionality and ethanol consumption. **Mammalian Genome**, Florianópolis, v. 22, n. 5-6, p. 329-340. 2011.

IWASE, Tadayuki et al. Isolation and identification of ATP-secreting bacteria from mice and humans. **Journal of clinical microbiology**, Tokyo, v. 48, n. 5, p. 1949-1951, mai. 2010.

JURASCHEK, Stephen P. et al. Plasma lactate and incident hypertension in the atherosclerosis risk in communities study. **American journal of hypertension**, Baltimore, v. 28, n. 2, p. 216-224, fev. 2014.

KHALIL, Raouf. Sex hormones as potential modulators of vascular function in hypertension. **Hypertension**, v. 46, n. 2, p. 249-254, mai. 2005.

KIM, Doe-Young; CAMILLERI, Michael. Serotonin: a mediator of the brain–gut connection. **The American journal of gastroenterology**, Rochester, v. 95, n. 10, p. 2698, out. 2000.

KIMURA, Ikuo et al. Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). **Proceedings of the national academy of sciences**, Durham, v. 108, n. 19, p. 8030-8035, out. 2011.

KING, Helen Dean. The growth and variability in the body weight of the albino rat. **The Anatomical Record**, v. 9, n. 10, p. 751-776, fev. 1915.

KNOOP, K.A. et al. Antibiotics promote inflammation through the translocation of native commensal colonic bacteria. **Gut**, v. 65, n. 7, p. 1100-1109, 2016.

KOLLEF, M.H. Bench-to-bedside review: antimicrobial utilization strategies aimed at preventing the emergence of bacterial resistance in the intensive care unit. **Critical Care**, v. 9, n. 5, p. 459, 2005.

KURTZ, Theodore W. et al. Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals: part 2: blood pressure measurement in experimental animals: a statement for professionals from the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research. **Hypertension**, v. 45, n. 2, p. 299-310, dez. 2005.

LAY, Christophe et al. Design and validation of 16S rRNA probes to enumerate members of the *Clostridium leptum* subgroup in human faecal microbiota. **Environmental microbiology**, Jouy-en-Josas, v. 7, n. 7, p. 933-946, set. 2005.

LEHOHLA, Molupe; KELLAWAY, Lauriston; RUSSELL, Vivienne Ann. NMDA receptor function in the prefrontal cortex of a rat model for attention-deficit hyperactivity disorder. **Metabolic brain disease**, Cidade do Cabo, v. 19, n. 1-2, p. 35-42, jun. 2004.

LI, Jing et al. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. **Microbiome**, Pequim, v. 5, n. 1, p. 14, fev. 2017.

LIANG, Shan; WU, Xiaoli; JIN, Feng. Gut brain psychology: rethinking psychology from the microbiota–gut–brain axis. **Frontiers in integrative neuroscience**, Pequim, v. 12, p. 33, Set. 2018.

LORENZ, Robert et al. The relationship between reproductive performance and blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. **American journal of obstetrics and gynecology**, Pensilvânia, v. 150, n. 5, p. 519-523, nov. 1984.

MA, Yonghui et al. Ethical Issues in Fecal Microbiota Transplantation in Practice. **The American Journal of Bioethics**, Fujian, v. 17, n. 5, p. 34–45, mai. 2017.

MARCIL, Josée; THIBAUT, Christelle; ANAND-SRIVASTAVA, Madhu B. Enhanced expression of Gi-protein precedes the development of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Journal of molecular and cellular cardiology**, Québec v. 29, n. 3, p. 1009-1022, mar. 1997.

MARCONDES, F.K., BIANCHI, E.J., TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats:some helpful considerations. **Brazilian Journal Biology**, São Carlos, v. 62, p. 609-614, nov. 2002.

MARQUES, Francine Z.; MACKAY, Charles R.; KAYE, David M. Beyond gut feelings: how the gut microbiota regulates blood pressure. **Nature Reviews Cardiology**, Vitória, v. 15, n. 1, p. 20, jan. 2018.

MARTIN, Clair R. et al. The brain-gut-microbiome axis. **Cellular and molecular gastroenterology and hepatology**, Los Angeles, v. 6, n. 2, p. 133-148, nov. 2018.

MAYER, Emeran Gut feelings: the emerging biology of gut–brain communication. **Nature Reviews Neuroscience**, Los Angeles, v. 12, n. 8, p. 453, jul. 2011.

MCCARTY, Richard; KOPIN, Irwin J. Pregnancy: its effects on blood pressure, heart rate and sympatho-adrenal activity in spontaneously hypertensive rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 158, n. 2, p. 242-244, jun. 1978.

MEDDINGS, Jon B.; SWAIN, M. G. Environmental stress–induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat. **Gastroenterology**, Alberta, v. 119, n. 4, p. 1019-1028, out. 2000.

MIGUEL, M. et al. Antihypertensive effect of peptides obtained from *Enterococcus faecalis*-fermented milk in rats. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 9, p. 3352-3359, 2006.

MILLER, Valery T. et al. Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women: the postmenopausal estrogen/progestin interventions (PEPI) trial. **Jama**, Los angeles, v. 273, n. 3, p. 199-208, nov. 1995.

MUGUERZA, B. et al. Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, Burgos, v. 16, n. 1, p. 61–69, jan. 2006.

MULLER, Norbert; MYINT, Aye-Mu; J SCHWARZ, Markus. Kynurenine pathway in schizophrenia: pathophysiological and therapeutic aspects. **Current pharmaceutical design**, Munique, v. 17, n. 2, p. 130-136, jan. 2011.

NELSON, James et al. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. **Biology of reproduction**, Los Angeles, v. 27, n. 2, p. 327-339, set. 1982.

NEUFELD, K.M. et al. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 23, p. 255–264, 2011

NISHINO, R. et al. Commensal microbiota modulate murine behaviors in a strictly contamination-free environment confirmed by culture-based methods. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 25, n. 6, p. 521-e371, 2013.

OKAMOTO, Kozo; AOKI, Kyuzo. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese circulation journal**, Kyoto, v. 27, n. 3, p. 282-293, jan. 1963.

ONDETTI, M. A., RUBIN, B., & CUSHMAN, D. W. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. **Science**, v. 196, p. 441–444, 1977.

PELLOW, Sharon et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, Londres, v. 14, n. 3, p. 149-167, ago. 1985.

PERTILE, R.N. et al. The quinpirole hypolocomotive effects are strain and route of administration dependent in SHR and SLA16 isogenic rats. **Behavior Genetics**, Florianópolis, v. 47, n. 5, p. 552-563, set. 2017.

PEVNER-FISCHER, Meirav et al. The gut microbiome and hypertension. **Current opinion in nephrology and hypertension**, Jerusalem, v. 26, n. 1, p. 1-8, jan. 2017.

PINILLA, Leonor et al. Mechanism of reproductive deficiency in spontaneously hypertensive rats. **Physiology & behavior**, Cordoba, v. 51, n. 1, p. 99-104, jan. 1992.

PLUZNICK, Jennifer L. et al. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New Haven, v. 110, n. 11, p. 4410-4415, mar. 2013.

PRIPP, Ulla et al. A randomized trial on effects of hormone therapy on ambulatory blood pressure and lipoprotein levels in women with coronary artery disease. **Journal of hypertension**, v. 17, n. 10, p. 1379-1386, 1999.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-2, p. 3-33, 2003.

QIN, Junjie et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **nature**, Copenhagen, v. 464, n. 7285, p. 59, mar. 2010.

QUIRÓS, Ana., et al. Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. **International Dairy Journal**, Madrid, v. 17, n. 1, p. 33-41, jan. 2007.

RAMOS, André et al. Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality-related behavior in rats. **Molecular Psychiatry**, Florianópolis, v. 4, n. 5, p. 453-462, out. 1999.

RAMOS, A. Animal models of anxiety: do i need multiple tests? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 10, p. 493-498, 2008.

RECKELHOFF, Jane F. et al. Gender differences in the development of hypertension in SHR. **Hypertension**, Mississippi, v. 34, n. 2, ago. 1999.

REIKVAM, Dag Henrik et al. Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. **PloS one**, Oslo, v. 6, n. 3, p. e17996, mar. 2011.

ROBERTSON, B.A. CLEMENTS, K.M. WAINWRIGHT, P.E. The working memory capabilities of the spontaneously hypertensive rat. **Physiology & Behavior**, Waterloo, v. 94, n. 3, p. 481-486, jun. 2008.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine plus-maze test of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Leeds, v. 52, n. 2, p. 297-303, out. 1995.

RUDZKI, Leszek; SZULC, Agata. "Immune gate" of psychopathology—the role of gut derived immune activation in major psychiatric disorders. **Frontiers in psychiatry**, Bialystok, v. 9, p. 205, mai. 2018.

RUSSELL, Vivienne Ann. Hypodopaminergic and hypernoradrenergic activity in prefrontal cortex slices of an animal model for attention-deficit hyperactivity disorder—the spontaneously hypertensive rat. **Behavioural brain research**, Cidade do Cabo, v. 130, n. 1-2, p. 191-196, mar. 2002.

SANTISTEBAN, Monica et al. Hypertension-linked pathophysiological alterations in the gut. **Circulation research**, Gainesville, v. 120, n. 2, p. 312-323, out. 2017.

SHARMA, Ravindra et al. Microglial cells impact gut microbiota and gut pathology in angiotensin II-induced hypertension. **Circulation Research**, Florida, v. 124, n. 5, p. 727–736, jan. 2019.

SHI Peng et al. Brain microglial cytokines in neurogenic hypertension. **Hypertension**, Florida, v. 56, n. 2, p. 297–303, jun. 2010

SAGVOLDEN, T. et al. Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). **Neuroscience & Biobehavior Reviews**, v. 24, n. 1, p. 31-39, 2000.

SAKURAI, Jun et al. Effect of *Clotridium perfringens* beta toxin on blood pressure of rats. **Microbiology and Immunology**, Yamashiro, v. 28, p. 23–31, jan. 1984.

SAKURAI, Jun et al. Pharmacological effect of beta toxin of *Clotridium perfringens* type C on rats. **Microbiology Immunology**, Yamashiro, v. 23, p. 423–432, fev. 1981.

SATOKARI, R. et al. Simple faecal preparation and efficacy of frozen inoculum in faecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection—an observational cohort study. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, Helsinque, v. 41, n. 1, p. 46-53, out. 2015.

SAVAGE, Dwayne C. Microbial biota of the human intestine: a tribute to some pioneering scientists. **Current issues in intestinal microbiology**, Knoxville, v. 2, n. 1, p. 1-15, 2001.

SKEGGS, L.T.; KAHN, J.E.; SHUMWAY, N.P. Preparation and function of the hypertensin converting enzyme. **Journal of Experimental Medicine**, v. 103, p. 295–299, 1956.

SORENSEN, Morten et al. Temporal changes in clinic and ambulatory blood pressure during cyclic post-menopausal hormone replacement therapy. **Journal of hypertension**, v. 18, n. 10, p. 1387-1391, out. 2000.

STRANDWITZ, Philip. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. **Brain research**, Bostom, v. 1693, p. 128-133, ago. 2018.

SZEKACS, Bela et al. Hormone replacement therapy reduces mean 24-hour blood pressure and its variability in postmenopausal women with treated hypertension. **Menopause**, Nova York, v. 7, n. 1, p. 31-35, 2000.

TAKEZAWA, Hiroto et al. Circadian and estrous cycle-dependent variations in blood pressure and heart rate in female rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 267, n. 5, p. R1250-R1256, nov. 1994.

TING WONG, C. Guin; BOTTIGLIERI, Teodoro; SNEAD III, O. Carter. Gaba,  $\gamma$ -hydroxybutyric acid, and neurological disease. **Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society**, Toronto, v. 54, n. S6, p. S3-S12, jul. 2003.

TOPPING, David; CLIFTON, Peter. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiological reviews**, Adelaide, v. 81, n. 3, p. 1031-1064, jul. 2001.

TORAL, Marta et al. Role of the immune system in vascular function and blood pressure control induced by faecal microbiota transplantation in rats. **Acta Physiologica**, Granada, p. e13285, abr. 2019.

TUNAPONG, Wannipa et al. Chronic treatment with prebiotics, probiotics and synbiotics attenuated cardiac dysfunction by improving cardiac mitochondrial dysfunction in male obese insulin-resistant rats. **European journal of nutrition**, v. 57, n. 6, p. 2091-2104, set. 2018.

UBEDA, C. et al. Vancomycin-resistant Enterococcus domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 12, p. 4332-4341, 2010.

UTIAN, Wulf H. Effect of postmenopausal estrogen therapy on diastolic blood pressure and bodyweight. **Maturitas**, Cleveland, v. 1, n. 1, p. 3-8, 1978.

WAISMAN, Ari; HAUPTMANN, Judith; REGEN, Tommy. The role of IL-17 in CNS diseases. **Acta neuropathologica**, Mainz, v. 129, n. 5, p. 625-637, mai. 2015.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open field test: a critical review. **Psychological Bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.

WIKOFF, William R. et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. **Proceedings of the national academy of sciences**, San diego, v. 106, n. 10, p. 3698-3703, mar. 2009.



WILCK, Nicola et al. Salt-responsive gut commensal modulates TH17 axis and disease. **Nature**, Berlin, v. 551, n. 7682, p. 585, nov. 2017.

WOODS, James et al. Oral contraceptives and hypertension. **Lancet**, Chapel Hill, v. 2, n. 7517, p. 653-653, 1967.

YANG, Tao et al. Gut dysbiosis is linked to hypertension. **Hypertension**, Florida, v. 65, n. 6, p. 1331-1340, fev. 2015.

ZHAO, Xin et al. Arterial pressure monitoring in mice. **Current protocols in mouse biology**, v. 1, n. 1, p. 105-122, mar. 2011.