



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Lívia Budziarek Eslabão

**Avaliação da composição e funcionalidade metabólica da microbiota intestinal murina
em resposta a desnutrição infantil e a imunização anti-varicela-zoster**

Florianópolis

2021

Lívia Budziarek Eslabão

Avaliação da composição e funcionalidade metabólica da microbiota intestinal murina em resposta a desnutrição infantil e a imunização anti-varicela-zoster

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina

Orientador: Prof. Carlos R. Zárate-Bladés Dr.

Coorientador: Prof. Oscar Bruna-Romero Dr.

Florianópolis

2021

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

Eslabão, Livia

Avaliação da composição e funcionalidade metabólica da microbiota intestinal murina em resposta a desnutrição infantil e a imunização anti-varicela-zoster / Livia Eslabão ; orientador, Carlos R. Zárate-Bladés, coorientador, Oscar Bruna-Romero , 2022.

195 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. microbiota intestinal. 3. desnutrição. 4. metabolismo. 5. sistema imune. I. R. Zárate-Bladés, Carlos. II. Bruna-Romero , Oscar. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Lívia Budziarek Eslabão

**Avaliação da composição e funcionalidade metabólica da microbiota intestinal murina
em resposta a desnutrição infantil e a imunização anti-varicela-zoster**

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

Prof. Dr. Carlos Rodrigo Zárate-Bladés
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr^a. Pryscilla Fanini Wowk
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) Paraná

Prof. Dr. Rubens Tadeu Delgado Duarte
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade
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 doutor em Biotecnologia e Biociências.

Prof. Dr. Glauber Wagner
Coordenador do Programa

Prof. Dr. Carlos Rodrigo Zárate-Bladés
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, minha irmã e meu companheiro pelo apoio, compreensão e carinho durante esse período.

Agradeço ao meu orientador Prof. Carlos Rodrigo Zárate-Bladés por toda ajuda e dedicação que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho, além da viabilização dos experimentos realizados.

Agradeço ao meu coorientador Prof. Oscar Bruna-Romero pelo auxílio e apoio no desenvolvimento desse trabalho e viabilização do sequenciamento da microbiota.

Agradeço aos colegas de laboratório iReg e de LIA, principalmente aos colegas Gabriela Gubert e Lucas Beltrame, os quais foram essenciais para a realização do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, ao corpo docente, aos técnicos e aos colegas discentes. Agradeço também a secretaria de Pós-Graduação pelo auxílio e disponibilidade.

A UFSC pela excelência institucional.

E, por fim, CAPES pelo financiamento do doutorado.

RESUMO

Microbiota é o conjunto de microrganismos comensais que estabelecem uma relação simbiótica com o hospedeiro em pele e mucosas. Uma causa maior de alteração da microbiota (disbiose) é a desnutrição, principal causa de morte no mundo de crianças abaixo de 5 anos de idade. O presente estudo buscou caracterizar o impacto da desnutrição infantil e do uso profilático de cotrimoxazol (SXT) na composição e na funcionalidade da microbiota intestinal de camundongos C57BL/6 (Capítulo I) através do sequenciamento do gene 16S rRNA. Animais submetidos a desnutrição (UND) apresentaram aumento de Bacteroidetes e redução de Firmicutes, além de aumento de vias metabólicas relacionadas com síndromes metabólicas na vida adulta. O uso profilático de SXT associado à desnutrição (UND+SXT) resultou na indução de um perfil de disbiose da microbiota intestinal distinto dos perfis observados em animais UND e SXT, com redução da família Clostridiaceae e da via do ciclo da ureia. O capítulo II caracterizou perfis de microbiota e de suas funções metabólicas após a recuperação alimentar em curto e longo prazo, e relacionar sua relação com o sistema imune. A recuperação alimentar não reestabeleceu um perfil normal de microbiota nem de seu metabolismo, mas levou à redução de Proteobacteria e aumento de Bacteroidetes além de alterações de vias metabólicas associadas a síndromes do duplo fardo da desnutrição. Já 20 semanas após a recuperação alimentar (longo prazo), observou-se uma maior homogeneidade nas microbiotas de animais CON e UND. Entretanto, o metabolismo dos animais UND ainda apresentou características associadas com doenças metabólicas, inflamação intestinal e permeabilidade do epitélio. A caracterização da resposta imune se deu em relação ao perfil de células B a médio prazo após a desnutrição. Populações de linfócitos B maduros, de memória, percussores de memória e foliculares se encontraram elevadas em animais que sofreram desnutrição na infância. Animais UND que recebem imunização com vacina via atenuada anti-varicela zoster, apresentaram microbiotas funcionalmente distintas à longo prazo. O estudo demonstrou que a desnutrição provoca disbiose da microbiota intestinal com consequências nas suas funções metabólicas e no sistema imune em longo prazo.

Palavras-chave: microbiota intestinal, desnutrição, metabolismo, cotrimoxazol, sistema imune, varicela-zoster.

ABSTRACT

Microbiota is the group of commensal microorganisms that establish a symbiotic relationship with the host in skin and mucosal membranes. A major cause of microbiota alteration (dysbiosis) is undernutrition, which is the leading cause of death in children under 5 years of age worldwide. The present study aimed to characterize the impact of childhood undernutrition and the prophylactic use of cotrimoxazole (SXT) on the composition and functionality of the intestinal microbiota of C57BL/6 mice (Chapter I) sequencing of 16S rRNA gene. Undernourished animals (UND) showed increase in Bacteroidetes and reduction in Firmicutes, as well as increase in metabolic pathways related to metabolic syndromes in adulthood. The prophylactic use of SXT in association with undernutrition (UND+SXT) resulted in the induction of dysbiosis profile of the gut microbiota distinct from the profiles observed in UND and SXT animals, with reduction in the Clostridiaceae family and the urea cycle pathway. Chapter II of the study aimed to characterize the microbiota profiles and their metabolic functions after short- and long-term of nutritional recovery, and to associate these observations to the immune system. The nutritional recovery did not re-establish a normal gut microbiota composition and metabolism. Nonetheless, it led to a reduction in Proteobacteria and increase in Bacteroidetes, in addition to changes in metabolic pathways associated with double-burden undernutrition syndromes. On the contrary, 20 weeks after nutritional recovery (long-term), a greater homogeneity in the microbiota of CON and UND animals was observed. However, the microbiota metabolism of UND animals still showed characteristics associated with metabolic diseases, intestinal inflammation, and epithelial permeability. The characterization of the immune response focused in the B-cell compartment at medium term after malnutrition. Populations of mature, memory, memory precursors and follicular B lymphocytes were found to be elevated in animals that were undernourished in childhood. Moreover, UND animals that received immunization with anti-varicella-zoster live-attenuated vaccine, presented functionally distinct microbiota at long-term evaluation. This study demonstrated that undernutrition causes dysbiosis in the intestinal microbiota with consequences on its metabolic functions and the immune system at long-term.

Keywords: gut microbiota, undernutrition, metabolism, cotrimoxazole, immune system, varicella-zoster.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Changes in body weight during undernourishment induction through food restriction.62
- Figura 2.** The gut microbiota composition and inferred functional content of gut microbiota between control (CON) and undernourished (UND) C57BL/6 mice.65
- Figura 3.** The gut microbiota composition and inferred functional content of gut microbiota between of control (CON) and cotrimoxazole (SXT) C57BL/6 mice.68
- Figura 4.** The gut microbiota composition and inferred functional content of gut microbiota between of control (CON) and cotrimoxazole-treated undernourished (UND-SXT) C57BL/6 mice.70
- Figura 5.** The gut microbiota composition and inferred functional content of gut microbiota between of control (CON), undernourished (UND), and cotrimoxazole-treated undernourished (UND-SXT) C57BL/6 mice.73
- Figura 6.** Representação do delineamento experimental do capítulo 2.95
- Figura 7.** A desnutrição durante a infância resulta em redução drástica de peso, que é revertida com a reposição alimentar.102
- Figura 8.** Animais que foram submetidos à desnutrição infantil apresentam um maior ganho de peso por dia após a reintrodução alimentar.104
- Figura 9.** Desnutrição durante a infância resultou em alterações no tamanho do intestino delgado e no peso do coração.107
- Figura 10.** Curva de rarefação do sequenciamento.111
- Figura 11.** A microbiota de camundongos C57BL/6 UND não apresenta o mesmo perfil da microbiota de camundongos C57BL/6 CON após o final do período de recuperação alimentar.113
- Figura 12.** Camundongos C57BL/6 UND apresentam alterações na composição e funcionalidade da microbiota intestinal mesmo após recuperação alimentar.116
- Figura 13.** Os efeitos da desnutrição durante a infância na alpha e beta diversidade da microbiota intestinal são amenizados a longo prazo.119
- Figura 14.** Os efeitos da desnutrição na composição e funcionalidade da microbiota ainda são marcantes mesmo 20 semanas após o final do protocolo de recuperação.122
- Figura 15.** O perfil da microbiota intestinal de camundongos desnutridos e vacinados (UND e UND+VZV) apresenta características similares aos grupos controles (CON e VZV) após 20 semanas de reestabelecimento alimentar.124

Figura 16. A composição e funcionalidade da microbiota intestinal de camundongos desnutridos e vacinados (UND e UND+VZV) apresenta características similares aos grupos saudáveis (CON e VZV) após 20 semanas de reestabelecimento alimentar.	127
Figura 17. Estratégia de <i>gates</i> utilizada para as análises de citometria de fluxo da resposta imune de células B em camundongos C57BL/6.	128
Figura 18. A desnutrição apresenta efeito na resposta imune a curto prazo, alterando a presença de células B maduras em relação ao número total.	130
Figura 19. A desnutrição apresenta efeito na resposta imune a curto prazo, alterando a presença de células B foliculares.	131
Figura 20. A desnutrição apresenta efeito na resposta imune a curto prazo, alterando a presença de células B de memória tanto em relação a frequência quanto ao número total.....	132
Figura 21. A desnutrição apresenta efeito na resposta imune a curto prazo, alterando a presença de células B precursoras de memória.	133
Figura 22. A desnutrição não influencia a resposta imune a curto prazo com relação as células B centro germinativo.	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificações gerais da desnutrição	25
Tabela 2. Descrição dos painéis de anticorpos utilizados para imunofenotipagem dos linfócitos isolados do baço dos camundongos ao final do experimento.	100
Tabela 3. Descrição das medidas analisadas como o comprimento do corpo e os tamanhos de cauda, de intestino grosso e de fêmur, além do peso do fígado e dos rins, em camundongos C57BL/6.	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	5-hidroxitriptamina
ACE2	Enzima 2 conversora de angiotensina 1 (<i>angiotensin I-converting enzyme 2</i>)
AhR	Receptor aril-hidrocarboneto
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
Bcl-2	Família de genes anti-apoptóticos (linfoma de células B 2 – <i>B-cell lymphoma 2</i>)
BS-MIP	Biotério Setorial do departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
BSA	Albumina sérica bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
CCL	Ligante de quimiocina C-C (<i>C-C chemokine ligand</i>)
CCR	Receptor de quimiocina C-C (<i>C-C chemokine receptor</i>)
CD	Grupamento de diferenciação (<i>cluster of differentiation</i>)
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CXCR	Receptor de quimiocina C-X-C (<i>C-X-C chemokine receptor</i>)
DBM	Duplo fardo da desnutrição (<i>double burden of malnutrition</i>)
DC	Células dendríticas (<i>dendritic cells</i>)
DMEM	meio <i>Dulbecco's Modified Eagle</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EGF	Fator de crescimento epidérmico (<i>epidermal growth factor</i>)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
F75	Fórmula alimentícia 75 quilogramas por 100 ml de leite
FBS	Soro fetal bovino
FDR	Taxa de falsas descobertas de Benjamini–Hochberg
FRC	Células reticulares fibroblásticas (<i>fibroblastic reticular cells</i>)
GALT	Tecido linfoide associado ao intestino (<i>gut associated lymphoid tissue</i>)
GF	Livre de microbiota (<i>germ-free</i>)
GH	Hormônio do crescimento (<i>growth hormone</i>)
GPR43	Receptor 43 acoplado a proteína G (<i>G-protein coupled receptor 43</i>)
HAZ	Escore-z da altura por idade
HBsAg	Antígeno de superfície da hepatite B
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano isotipo DR (<i>human leukocyte antigen DR isotype</i>)
IEL	Linfócitos intraepiteliais
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (<i>insulin-like growth factor-1</i>)
IL	Interleucina
I.M.	Intramuscular

I.P.	Intraperitoneal
LDA	Análise linear discriminante
LEfSe	Análise linear discriminante do tamanho do efeito
LPS	Lipopolissacarídeo
MAM	Desnutrição aguda moderada (<i>moderate acute malnutrition</i>)
MAZ	Escore-z da microbiota por idade
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (<i>major histocompatibility complex</i>)
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos (<i>mammalian target of rapamycin</i>)
MUAC	Medida da circunferência do meio da parte superior do braço (<i>mid-upper-arm circumference</i>)
NF-κB	Fator nuclear de cadeia leve κ potencializador de células B ativadas (<i>nuclear factor κ-light-chain enhancer of activated B cells</i>)
NK	Células exterminadoras naturais (<i>natural killer</i>)
NO	Óxido nítrico
NOS2	Óxido nítrico sintetase 2 (<i>nitric oxide synthase 2</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Regiões de leitura aberta (<i>open reading frames</i>)
OVA	Ovalbumina
OTU	Unidade taxonômica operacional (<i>operational taxonomic unit</i>)
PBS	Solução salina fosfatada
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas (<i>platelet-derived growth factor</i>)
PEM	Desnutrição proteica-energética (<i>protein-energy malnutrition</i>)
PHA	Fitohemaglutinina
PSA	Polissacarídeo A de superfície
P/I	Peso por idade
RegIII-γ	Proteína regeneradora derivada de ilhota 3 gamma (<i>Regenerating islet-derived protein III gamma</i>)
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
RSV	Vírus sincicial respiratório
RUTF	Alimentação terapêutica pronta para o uso (<i>ready-to-use therapeutic food</i>)
SAM	Desnutrição severa aguda (<i>severe acute malnutrition</i>)
SCFA	Ácidos graxos de cadeia curta (<i>short chain fatty acids</i>)
SCID-hu	Modelo experimental murino humanizado com imunodeficiência severa combinada
SFB	Bactérias filamentosas segmentadas (<i>segmented filamentous bacteria</i>)
SISVAN	Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição (<i>signal transducer and activator of transcription</i>)
SUS	Sistema Único de Saúde
SXT	Cotrimoxazol
TCR	Receptor de células T (<i>T cell receptor</i>)
TGF	Fator de crescimento transformante (<i>transforming growth factor</i>)
Th	Células T auxiliares (<i>helper T cells</i>)

Thy1	Antígeno 1 de diferenciação de timócitos (<i>thymocyte differentiation antigen 1</i>)
TIV	Influenza trivalente inativada
TLR	Receptor do tipo <i>Toll</i> (<i>Toll-like Receptor</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>tumor necrosis factor</i>)
UFP	Unidades formadoras de placa
VZV	Vírus varicela-zoster (<i>varicella-zoster virus</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	MICROBIOMA.....	16
1.2	MICROBIOMA E SISTEMA IMUNE	18
1.3	MICROBIOMA E DESNUTRIÇÃO INFANTIL.....	24
1.4	IMPACTO NA MICROBIOTA INTESTINAL DO USO PROFILÁTICO DE ANTIBIÓTICO PARA CASOS DE DESNUTRIÇÃO.....	33
1.5	MUDANÇAS DA RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA COMO CONSEQUÊNCIAS DA DISBIOSE E ALTERAÇÕES NUTRICIONAIS.....	37
1.6	A VACINA CONTRA O VÍRUS VARICELA-ZOSTER COMO MODELO BIOLÓGICO PARA ANALISAR A INTERAÇÃO MICROBIOMA, DESNUTRIÇÃO E SISTEMA IMUNE.....	48
2	HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	52
2.1	HIPÓTESE.....	52
2.2	OBJETIVO GERAL.....	52
2.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
3	METODOLOGIA.....	53
4	RESULTADOS.....	54
4	CAPÍTULO I	55
4.1	Abstract.....	56
4.2	Introduction.....	57
4.3	Materials and Methods.....	58
4.4	Results.....	61
4.4.1	Changes in body weight and daily weight gain in C57BL/6 mice during undernourishment induction	61
4.4.2	Effects of undernourishment on the microbiota composition and function..	62
4.4.3	Effects of Cotrimoxazole (SXT) on the gut microbiome.....	66
4.4.4	Impact of the combination of undernourishment and the use of cotrimoxazole (UND+SXT) on microbiota composition and function	69

4.4.5	The use of cotrimoxazole during undernourishment in infant mice does not revert undernutrition effects on microbiota, but results in a distinct profile of dysbiosis...	71
4.5	Discussion.....	74
4.6	Conclusions.....	80
4.7	References.....	82
5	CAPÍTULO II.....	90
5.1	Introdução.....	91
5.2	Metodologia.....	93
5.3	Resultados	101
5.3.1	Avaliação do peso de camundongos submetidos a protocolo de desnutrição energético-proteica durante a infância, de recuperação nutricional e de posterior acompanhamento a curto e a longo prazo	101
5.3.2	Alterações no tamanho de órgãos de camundongos C57BL/6 adultos, submetidos a desnutrição durante a infância.....	106
5.3.3	Desnutrição durante a infância resulta alterações em famílias e gêneros específicos na composição da microbiota intestinal de camundongos C57BL/6.....	110
5.3.4	Avaliação funcional em camundongos adultos dos efeitos decorrentes da desnutrição energético-proteica durante a infância.....	123
5.3.5	Desnutrição durante a infância resulta em alterações no compartimento de células B em camundongos C57BL/6 adultos.....	128
6	DISCUSSÃO.....	136
7	CONCLUSÕES.....	160
8	PERSPECTIVAS.....	160
9	REFERÊNCIAS.....	161
10	ANEXOS.....	195

1 INTRODUÇÃO

1.1 MICROBIOMA

A microbiota é descrita como a comunidade de microrganismos que estabelece uma relação simbiótica com o seu hospedeiro. No caso da microbiota intestinal são o conjunto de microrganismos comensais que residem o intestino (AL-RASHIDI, 2021). O termo microbioma é utilizado tanto para descrever o complexo ecossistema que habita a pele ou a mucosa do hospedeiro através do estabelecimento de uma relação simbiótica, quanto para descrever o conjunto genômico de todos os microrganismos, simbioses e patogênicos, vivendo nas superfícies e nas cavidades de todos os vertebrados (PAN; CHEN, 2020; TANEJA, 2017). O microbioma intestinal é então composto pela coleção de genomas de microrganismos que habitam o intestino, entre eles estão as bactérias, as archaeas, os vírus e os fungos (TANEJA, 2017). O intestino humano é colonizado por mais de 10^{14} microrganismos, os quais se distribuem entre 12 principais filos com cerca de 2000 espécies distintas, apresentando assim cerca de 150 a 500 vezes a mais o número de genes que o genoma humano (AL-RASHIDI, 2021; LAZAR et al., 2018).

De acordo com alguns autores, a colonização microbiana do intestino humano teria início já desde o período gestacional, apresentando uma composição variável entre os indivíduos e sendo capaz de sofrer mudanças parciais ao longo da vida de um mesmo indivíduo (GUZMAN et al., 2020; ROBERTSON et al., 2019; VENTURA et al., 2012). A coevolução da microbiota intestinal e do trato gastrointestinal humano levou ao estabelecimento de uma relação simbiótica, na qual a microbiota exerce influência sobre processos fisiológicos do hospedeiro enquanto o hospedeiro fornece um ambiente favorável à sobrevivência dessas comunidades (VALDEZ; BROWN; FINLAY, 2014; VENTURA et al., 2012).

A microbiota intestinal vem recebendo grande atenção pelo papel que desempenha em diversos processos vitais do hospedeiro entre os quais se destacam os movimentos peristálticos, a aquisição de nutrientes, a produção de vitaminas e outros nutrientes, a manutenção do pH intestinal, a proliferação e diferenciação celular intestinal, a modulação do sistema imune geral e a regulação de neurotransmissores (DING et al., 2019;

FERREIRA; ANTUNES; FINLAY, 2010; KIMURA et al., 2020; VENTURA et al., 2012). Um exemplo dessa interação é a produção de ácidos graxos de cadeia curta (*short chain fatty acids* - SCFA). Esses ácidos graxos são produzidos por microrganismos entéricos através da fermentação de fibras provenientes da dieta e possuem a capacidade de acidificar o microambiente gastrointestinal local, tornando-o menos habitável para a colonização ou supercrescimento de espécies patogênicas como a *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. (CHERRINGTON et al., 1991; FUJIMURA; LYNCH, 2015).

O primeiro ano de vida da criança é marcado pela maturação da microbiota intestinal neonatal com características mais simples para uma microbiota mais complexa com representantes tipicamente encontrados na microbiota do trato gastrointestinal adulto, apresentando enriquecimento principalmente de Bacteroidetes e Firmicutes (BÄCKHED et al., 2015; IHEKWEAZU; VERSALOVIC, 2018; TANAKA; NAKAYAMA, 2017). É durante esse primeiro ano de vida que a microbiota infantil passa a apresentar funcionalidade similar ao metagenoma materno, com redução da variação entre indivíduos (BÄCKHED et al., 2015). Além disso, a maturação da microbiota infantil durante esse primeiro ano é responsável também pelo aumento no número de genes bacterianos com importância para o metabolismo de polissacarídeos provenientes de plantas, fato que ocorre mesmo antes da introdução de alimentos sólidos (KOENIG et al., 2011). A introdução de alimentação sólida é capaz sustentar as mudanças ocorridas na microbiota intestinal, além de resultar em mudanças no metabolismo do indivíduo, como a expressão de genes relevantes para o metabolismo de carboidratos, a biossíntese de vitaminas e a degradação xenobiótica.

A disponibilidade de nutrientes possui um impacto direto na composição e na abundância dos microrganismos comensais, resultando em alterações no metabolismo nutricional e, por consequência, modificando as interações entre hospedeiro e microrganismo (KAU et al., 2011; KOENIG et al., 2011). Estudos demonstram que a composição da microbiota intestinal de crianças desnutridas é diferente da observada em crianças saudáveis, sugerindo, portanto, alterações no metabolismo e, conseqüentemente, no sistema imune (GHOSH et al., 2014; GUPTA et al., 2011; MONIRA et al., 2011; POP et al., 2014; SUBRAMANIAN et al., 2014; ZHUANG et al., 2019).

Camundongos são comumente utilizados como modelos experimentais em estudos de microbiota intestinal, geralmente mimetizando desordens humanas, como por exemplo, obesidade e diabetes. Poucos estudos buscam a correlação entre a microbiota intestinal humana e a murina (KRYCH et al., 2013). Krych *et al.* (2013) demonstraram que a microbiota intestinal de linhagens de camundongos NOD, BALB/c e B6.V-Lep^{ob}/J modelos para diabetes apresentam características quantitativas (abundância relativa) distintas da microbiota intestinal humana. Porém, ambas microbiotas intestinais apresentam representantes em comum dos filos e dos gêneros presentes, resultando em uma composição similar entre as microbiotas e validando o uso de camundongos como modelos experimentais para estudos de microbiota intestinal com ênfase em desordens humanas.

1.2 MICROBIOMA E SISTEMA IMUNE

A resistência ou a susceptibilidade a um número substancial de doenças estão sendo associadas com a interação que ocorre entre a microbiota intestinal e o sistema imune (FERREIRA; ANTUNES; FINLAY, 2010; VALDEZ; BROWN; FINLAY, 2014). Essas interações ocorrem a partir do contato direto com determinados microrganismos constituintes da microbiota, ou do contato com determinados componentes moleculares derivados dos microrganismos ou a partir da identificação de metabolitos produzidos pelo microbioma.

Estudos recentes vêm identificando a presença de diversos microrganismos constituintes da microbiota intestinal com capacidades imunomodulatórias específicas capazes de regular por rotas diversas o desenvolvimento de células do sistema imune (IVANOV; HONDA, 2012; MAGWIRA; TAYLOR, 2018). Essas interações influenciam no comportamento tanto do sistema imune quanto da própria microbiota, fator que pode ser ilustrado no trato gastrointestinal de camundongos *germ-free* (GF) (FERREIRA; ANTUNES; FINLAY, 2010; SMITH; MCCOY; MACPHERSON, 2007).

Camundongos GF exibem organização e função inapropriadas dos tecidos da imunidade de mucosa (SMITH; MCCOY; MACPHERSON, 2007; VALDEZ; BROWN; FINLAY, 2014). Folicúlos linfóides isolados do intestino delgado não se desenvolvem em camundongos GF, além de serem deficientes em IgA secretora e linfócitos intraepiteliais

CD8 $\alpha\beta$ (HOOPER; LITTMAN; MACPHERSON, 2012). Entretanto, quando camundongos GF são colonizados com a microbiota de camundongos convencionais, muitas das deficiências apresentadas são restauradas a condições normais (HANSEN et al., 2012; VALDEZ; BROWN; FINLAY, 2014).

Tornou-se evidente que determinados perfis de espécies comensais influenciam no arranjo dos subtipos de linfócitos T presentes na lâmina própria (HOOPER; LITTMAN; MACPHERSON, 2012). Os trabalhos de Gaboriau-Routhiau *et al.* (2009) e de Ivanov *et al.* (2009) demonstraram em camundongos gnotobióticos que bactérias filamentosas segmentadas (SFB) presentes na microbiota intestinal são capazes de induzir a maturação das funções de células T adaptativas intestinais, resultando na acumulação de células Th17. Acredita-se que as SFB são capazes de penetrar na camada de muco que recobre as células epiteliais do íleo terminal, interagindo diretamente com as mesmas e induzindo a polimerização de actina no sítio de interação, esses eventos de sinalização vão resultar na polarização para células Th17 (GABORIAU-ROUTHIAU et al., 2009; IVANOV et al., 2009).

Bacteroides fragilis, pertencente ao filo Bacteroidetes, modula a homeostase de células T na mucosa através da promoção do desenvolvimento de células Th1 e da função de células T regulatórias (MAGWIRA; TAYLOR, 2018). Foi demonstrado que o polissacarídeo A de superfície (PSA), produzido por *B. fragilis* durante a fase inicial da sua colonização no intestino, promove a maturação celular e física do sistema imune em desenvolvimento. Camundongos GF possuem suas funções imunomodulatórias restauradas quando colonizados com *B. fragilis* produtor de PSA, sendo possível observar a reversão das deficiências imunológicas apresentadas pela ausência de microbiota, como deficiência em células T sistêmicas e desbalanço entre Th1/Th2, além de atuar também no direcionamento da organogênese linfoide (MAZMANIAN et al., 2005). O PSA é capaz de ativar células T CD4⁺ e estimular a produção de citocinas quando apresentado por células dendríticas intestinais. A capacidade do PSA de ser antígeno dependente de células T se deve principalmente pela sua estrutura zwitteriônica (dipolar), apresentando unidades poliméricas repetitivas com cargas positivas e negativas, que media a proliferação de

células T CD4+ *in vitro* (BRUBAKER et al., 1999; MAZMANIAN et al., 2005; TZIANABOS, 2002).

Além de atuar como fonte de energia, os SCFAs exercem efeitos diretos no sistema imunológico. Um exemplo é o butirato, proveniente de fermentação bacteriana de carboidratos, capaz de modificar o perfil de produção de citocinas de células T auxiliares (Th – T *helper*) e promover a integridade do epitélio intestinal, limitando a exposição do sistema imune de mucosa aos microrganismos presentes no lúmen intestinal e prevenindo resposta inflamatórias exacerbadas através da indução de células T regulatórias (BIRD et al., 1998; FURUSAWA et al., 2013; PENG et al., 2007).

De fato, nosso grupo participou de um estudo que recentemente demonstrou a importância dos SCFA produzidos pela microbiota intestinal, a partir de fibras da dieta, na resposta imune durante a infecção pulmonar contra o vírus sincicial respiratório (RSV) (ANTUNES et al., 2019). No trabalho foi demonstrado que a produção de acetato pela microbiota intestinal é responsável por conferir proteção contra o RSV em camundongos que fazem consumo de dietas ricas em fibras. Esse mecanismo mediado por acetato resulta no aumento da expressão de genes relacionados com a produção de IFN- β (Interferon β) que é importante para resposta anti-RSV nos pulmões.

Diversos estudos comprovaram que o uso de antibióticos apresenta um grande impacto na composição e na funcionalidade da microbiota intestinal, resultando na depleção de microrganismos essenciais para sinalizações através de receptores *Toll-like* (TLR) e para a produção de moléculas mediadoras do sistema imune, o que altera a resposta em todos os braços do sistema imune (BECATTINI; TAUR; PAMER, 2016; RAKOFF-NAHOUM et al., 2004). Estudo com voluntários saudáveis que receberam com antibiótico clindamicina por uma semana ou menos apresentaram efeitos na microbiota intestinal, os quais persistiam por 6 meses a 2 anos após o tratamento. Esses efeitos incluíam uma redução da diversidade microbiana (principalmente de espécies do gênero *Bacteroides*), surgimento de cepas resistentes a antibióticos e um maior nível de expressão de genes de resistência a antibióticos (JERNBERG et al., 2007).

Os efeitos de longa duração dos antibióticos podem resultar em alterações significativas e imprevisíveis na microbiota intestinal de indivíduos mais susceptíveis como, por exemplo, os recém-nascidos. Cerca de 40% dos recém-nascidos são expostos indiretamente a antibióticos através da administração dos mesmos na gestante no momento intraparto. Já foi observado que o efeito dessa administração intraparto é capaz de levar a mudanças na composição da microbiota infantil, as quais podem persistir por um período de pelo menos três meses (AZAD et al., 2013).

Em camundongos tratados com vancomicina, neomicina e metronidazol por curto período, foi observado uma diminuição da expressão de RegIII- γ (lectina do tipo C com propriedade bactericida) pelas células intestinais epiteliais e pelas células de Paneth. Essa alteração possibilitou a infecção dos camundongos por *Enterococcus* sp. resistentes à vancomicina. A administração oral de LPS foi capaz de reverter o quadro de infecção, já que LPS derivados da microbiota são os responsáveis por estimular receptores TLR-4 e re-induzir a expressão dos níveis basais de RegIII- γ no intestino, reestabelecendo a resposta imune inata contra o patógeno (BRANDL et al., 2008).

Entretanto, em trabalho recente desenvolvido pelo nosso grupo foi demonstrado que o uso de trimetoprim/sulfametoxazol (cotrimoxazol), associado ou não a desnutrição em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas, não apresentou alterações em relação a contagem diferencial de leucócitos quando comparados com camundongos controle (GUBERT, 2020). Porém, a manutenção da quantidade de células não necessariamente indica manutenção da funcionalidade das mesmas (CORWARE et al., 2014).

Células apresentadoras de antígenos também dependem da microbiota para orquestrar o sistema imune. Ichinohe *et al.* (2011) demonstraram que camundongos tratados com antibióticos (combinação de vancomicina, neomicina, metronidazol e ampicilina) e infectados pelo vírus influenza apresentavam uma redução na migração de células dendríticas e na produção de IL-1 β e IL-18. Os autores mostraram que os níveis de imunoglobulinas, o número de células T e a produção de IFN- γ eram consequentemente afetados, resultando em um aumento dos títulos virais. Entretanto, a administração local ou distal de ligantes de receptores TLR foi capaz de restaurar as alterações observadas nos

camundongos tratados com a combinação de antibióticos, levando a indução de uma resposta imune apropriada nos pulmões desses animais (ICHINOHE et al., 2011).

Por todas as características apresentadas, é considera-se que a microbiota comensal exerce influência sobre as respostas imunes, tanto locais quanto sistêmicas, estimuladas por antígenos vacinais (ELOE-FADROSH et al., 2013; FERREIRA; ANTUNES; FINLAY, 2010; VALDEZ; BROWN; FINLAY, 2014). Grassly *et al.* (2015) estimaram que, de aproximadamente 113 milhões de crianças vacinadas mundialmente contra infecções infantis, cerca de 4 a 19 milhões de crianças permanecem desprotegidas devido a uma eficácia limitada das vacinas (GRASSLY, 2015). A interação entre a microbiota comensal e o sistema imune, em conjunto com outros fatores ambientais e genéticos, pode contribuir para explicar as diferenças observadas na eficácia de vacinas em diferentes populações (FERREIRA; ANTUNES; FINLAY, 2010; VALDEZ; BROWN; FINLAY, 2014). Indivíduos com uma microbiota disbiótica, com inflamação crônica e com uma constante penetração no epitélio intestinal pelos microrganismos comensais, podem apresentar um aumento na exposição à antígenos, a qual pode levar uma a maior tolerância a vacinação e uma baixa eficácia em promover uma resposta imune apropriada (VALDEZ; BROWN; FINLAY, 2014). A disbiose é descrita como alterações na composição e na funcionalidade da microbiota (LEVY et al., 2017). Disbiose é geralmente caracterizada por uma ou mais condições, que podem incluir a explosão da colonização por patobiontes e a perda da diversidade (RIBEIRO et al., 2020b).

Lagos *et al.* (1999) demonstraram que o crescimento excessivo de bactérias no intestino delgado de crianças de países menos desenvolvidos pode ser um fator contribuinte para uma baixa resposta de anticorpos a vacina oral viva contra cólera CVD 103-HgR (LAGOS et al., 1999).

Eloe-Fadrosch *et al.* (2013) foram os primeiros a correlacionar microrganismos específicos da microbiota intestinal humana com a resposta imunológica contra uma vacina oral. Esse estudo foi capaz de correlacionar indivíduos que exibiam uma resposta imunológica multifásica ao antígeno tifoide, Ty21a, e uma maior riqueza e diversidade nas comunidades comensais quando comparados com indivíduos que exibiam apenas respostas imunes tardias.

Oh *et al.* (2014) demonstraram, em camundongos, o papel da microbiota de induzir a produção de IgG e IgM utilizando a via mediada por TLR-5 em resposta a vacina TIV (influenza trivalente inativada) e outras vacinas não adjuvadas. Nesse estudo, camundongos tratados com antibióticos e camundongos deficientes em TLR5 (*Tlr5*^{-/-}) exibiram produção deficiente de anticorpos contra a vacina TIV. A administração de flagelina, antagonista do TLR-5, em camundongos tratados com antibióticos, foi capaz de reverter a resposta humoral contra a vacina.

Lynn *et al.* (2018) demonstraram que a administração de antibióticos (ampicilina e neomicina) em camundongos fêmeas durante o final da gestação e o período de amamentação levou a um perfil de disbiose tanto nas fêmeas quanto na ninhada. Mesmo recuperando a carga bacteriana uma semana após a interrupção do tratamento, os camundongos jovens demonstraram mudanças significativas na composição da microbiota e, também, uma perda significativa da diversidade. Além disso, essas alterações permaneceram significantes por um período de até 13 semanas pós-tratamento com antibiótico. Outro ponto observado no estudo foi a influência da microbiota na resposta imune a vacinas, para isso foram analisadas vacinas comumente administradas nos primeiros meses de vida de crianças, as quais eram a vacina *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), a vacina meningocócica sorogrupo B, a vacina meningocócica sorogrupo C, a vacina pneumocócica, a vacina hexavalente (contendo antígenos da hepatite B, difteria, tétano, pertussis acelular, *Haemophilus influenzae* tipo b e o vírus da poliomielite inativado). Os camundongos jovens que foram expostos ao tratamento com antibióticos apresentaram resposta IgG antígeno-específica significativamente reduzida.

As vacinas são extremamente importantes no combate a doenças infecciosas, perdendo apenas para a disponibilidade de água potável (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). É estimado que a vacinação previne cerca de 6 milhões de mortes por ano no mundo (LYNN; PULENDRAN, 2017). Para garantir uma proteção eficaz, as vacinas precisam estimular diversos agentes do sistema imune. Entretanto, como demonstrado acima, o sistema imune é susceptível a uma gama de fatores, entre eles a microbiota intestinal. Trabalhos que correlacionem as alterações do sistema imune com o

perfil de microbiota intestinal se fazem necessários para possibilitar o desenvolvimento de estratégias a fim de garantir a proteção contra doenças infecciosas.

1.3 MICROBIOMA E DESNUTRIÇÃO INFANTIL

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define como desnutrição o desbalanço entre a ingestão de nutrientes e energia e as necessidades do organismo para manter a homeostase, as funções específicas e, no caso de crianças, o crescimento (DEVELOPMENT INITIATIVES, 2020). Mehta *et al.* (2013) sugere uma nova classificação de desnutrição, caracterizada pela correlação ou não com doença: desnutrição como resposta secundária a patologias, a cirurgias ou a traumas; e desnutrição como resposta secundária a fatores ambientais. Black *et al.* (2013) estimaram que, em 2010, mundialmente mais de 925 milhões de pessoas apresentaram um quadro de desnutrição e que o acesso a uma nutrição adequada seria capaz de eliminar um terço das doenças globais. A desnutrição infantil é a causa de 45% das mortes de crianças abaixo de 5 anos de idade (BLACK et al., 2013; PEKMEZ; DRAGSTED; BRAHE, 2019). Além do elevado número de óbitos, a desnutrição está associada a diversas sequelas na vida adulta, sendo que sobreviventes da desnutrição infantil apresentam um maior risco de desenvolverem alterações no desenvolvimento cognitivo e motor, obesidade e doenças não-comunicáveis (BLACK et al., 2013; KAU et al., 2011).

A OMS estabeleceu um protocolo de caracterização da desnutrição infantil em 1977 com base em dados antropométricos de peso e altura em relação a idade, visando facilitar a documentação de dados de diversos países, mesmo em regiões com escassez de recursos, e reduzir os erros através da uniformização das características apresentadas por indivíduos de diferentes populações. Portanto, estabelece-se o conceito estatístico de *score z*, o qual indica o desvio padrão em relação a uma curva padronizada referente ao crescimento infantil para determinada população, levando em consideração as diferenças de gênero (WATERLOW et al., 1977).

A desnutrição infantil pode ser classificada em diferentes categorias de acordo com as características apresentadas pelo indivíduo. Geralmente, classifica-se como desnutrição infantil proteica-energética (*protein-energy malnutrition* - PEM) os casos que resultam de

deficiência de proteína e calorias na dieta, geralmente acompanhados de deficiência em micronutrientes como zinco e ferro (IBRAHIM et al., 2017). Dentro da PEM, ainda é realizada uma subdivisão da desnutrição infantil em: abaixo do peso (baixo peso para altura < -2 desvios padrão), *wasting* (baixo peso para idade < -2 desvios padrão) e *stunting* (baixa estatura para idade < -2 desvios padrões). Geralmente, a classificação de abaixo do peso está relacionada com uma desnutrição aguda e/ou crônica, marasmo (*wasting*) com desnutrição aguda e *stunting* com desnutrição crônica (MILLION; DIALLO; RAOULT, 2017; PEKMEZ; DRAGSTED; BRAHE, 2019). A desnutrição clínica denominada de desnutrição severa aguda (*severe acute malnutrition* - SAM) se manifesta em duas síndromes maiores: marasmo, o qual é definido pelo valor do peso por altura abaixo de 3 desvios padrões da média para a idade e sexo do indivíduo e caracterizado pela perda de peso e atrofia muscular sem edema; e kwashiorkor, a qual apresenta a mesma definição de peso por altura do marasmo, mas é caracterizada pela presença de edema, esteatose hepática, erupções e ulcerações cutâneas e anorexia (IBRAHIM et al., 2017; SMITH et al., 2013). As classificações da desnutrição se encontram da Tabela 1.

Tabela 1. Classificações gerais da desnutrição.

Classificação	Descrição	Critério
Abaixo do peso	Alterações no crescimento linear (baixa altura para idade), no ganho de peso (baixo peso para idade), ou uma combinação de ambos. (IBRAHIM et al., 2017)	Peso por idade (P/I) abaixo da média. Leve (grau 1): 75-90% P/I. Moderado (grau 2): 60-74% P/I. Severo (grau 3): <60% P/I.
Deficiência em micronutrientes	Deficiência em vitaminas essenciais e minerais necessários para o desenvolvimento e crescimento saudáveis do indivíduo, além da correta funcionalidade fisiológicas. Podem apresentar sinais clínicos ou	Baseia-se em testes bioquímicos com comparações a valores de referência derivados de populações normais.

	sintomas quando crônicas ou severas. (IBRAHIM et al., 2017; WELLS et al., 2020)	
PEM	Descrição geral para desnutrição aguda resultante da ingestão insuficiente de proteína e energia (calorias). Consiste em um espectro de manifestações clínicas, porém é geralmente classificada em marasmo ou kwashiorkor. (GROVER; EE, 2009)	Sem critério definido, exceto pelas classificações de marasmo ou kwashiorkor.
Desnutrição aguda	Desnutrição resultante da ingestão insuficiente de alimentos, levando a perda aguda de massa corporal, mas sem alterações na altura pela idade. Pode ser classificada em MAM (desnutrição aguda moderada) ou SAM (desnutrição aguda severa). Quadro reversível com reabilitação nutricional adequada. (IBRAHIM et al., 2017)	A OMS caracteriza a desnutrição aguda com base no <i>score z</i> de peso por altura e na medida da circunferência do meio da parte superior do braço (MUAC – <i>mid-upper-arm circumference</i>). Leve: <i>score z</i> entre -1 e -2. Moderado: <i>score z</i> entre -2 e -3 ou MUAC entre 125 mm e 115 mm. Severo: <i>score z</i> < -3 ou MUAC < 115 mm.
SAM (<i>wasting</i> /marasmo)	Desnutrição aguda que resulta na perda de tecido adiposo e massa muscular. A criança com marasmo é magra para sua altura, mas não reflete necessariamente no comprimento da	Quadro severo: <i>score z</i> < -3 ou MUAC < 115 mm.

mesma. A face possui pele enrugada, bochechas fundas e olhos sobressalentes. A perda de tecido adiposo resulta em características de aparência idosa. O abdômen pode se encontrar inchado, com flacidez nas pernas e nádegas. São crianças geralmente irritadas e com grande apetite. (BRIEND; KHARA; DOLAN, 2015; GROVER; EE, 2009; IBRAHIM et al., 2017)

**SAM
(kwashiorkor)**

Desnutrição aguda severa que resulta de uma dieta pobre provavelmente associada a fatores ambientais. Crianças com kwashiorkor apresentam edema em ambos os pés e extremidades inferiores, podendo apresentar edema total (anasarca) em casos graves. Outro sintoma comum é a esteatose hepática. Presença de feridas na pele e nos cantos da boca. Pele pálida e com dermatose. São crianças apáticas e com pouco apetite. (GROVER; EE, 2009; IBRAHIM et al., 2017)

O diagnóstico de kwashiorkor não leve em considerações medidas antropométricas, mas sim a presença de edema bilateral nas extremidades inferiores.

**Desnutrição
crônica (*stunting*)**

Desnutrição resultante do consumo inadequado crônico ou recorrente, geralmente com a presença de inflamação sistêmica crônica. *Stunting* resulta em alterações no

A OMS caracteriza a desnutrição crônica com base no *score z* de altura por idade. Leve: *score z* entre -1 e -2. Moderado:

crescimento relacionadas com a baixa *score z* entre -2 e -3. altura para idade, comprometimento Severo: *score z* < -3. neurocognitivo e alterações metabólicas associadas com doenças crônicas em adultos como, por exemplo, diabetes mellitus e hipertensão. Os efeitos da desnutrição crônica são irreversíveis após os 24 meses de idade. (BRIEND; KHARA; DOLAN, 2015; IBRAHIM et al., 2017)

O relatório de nutrição global de 2020 apontou uma redução nos números de *stunting* em crianças com idade menor que 5 anos (DEVELOPMENT INITIATIVES, 2020). Os casos de *stunting* passaram de 165,8 milhões em 2012 para 149 milhões em 2018. Já os casos de *wasting* atingiram cerca de 49,5 milhões de crianças em 2018. Foi estimado também que cerca de 20,5 milhões de recém-nascidos apresentavam baixo peso ao nascer (DEVELOPMENT INITIATIVES, 2020). Porém, mesmo com a redução em grande parte dos índices avaliados no relatório, foi demonstrado que as metas globais de nutrição até 2025 se encontram fora de curso, ou seja, com os atuais números não será possível alcançar o valor alvo estipulado para anemia em mulheres com idade reprodutiva e *stunting*, *wasting* e obesidade em crianças. No Brasil, em 2021, cerca de 2,6% e 1,4% das crianças abaixo de 5 anos atendidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) apresentavam peso baixo para a idade e peso muito baixo para a idade, respectivamente (SISVAN, 2021). Além disso, 2,9% e 2,06% das crianças abaixo de 5 anos apresentavam magreza (baixo peso por altura) e magreza acentuada (peso muito baixo por altura). Os mesmos dados do Sistema de vigilância Alimentar e Nutricional (SISVAN) demonstram que cerca de 5,79% das crianças abaixo de 5 anos apresentam baixo índice de massa corporal por idade.

Devido à alta prevalência de casos de desnutrição infantil, calcula-se um custo de cerca de US\$3,5 trilhões por ano para a sociedade, aproximadamente US\$ 500 por indivíduo. Em contrapartida, a obesidade custa cerca de US\$500 bilhões por ano (PANEL.,

2016). Mesmo com esforços e investimentos para reverter os casos de desnutrição infantil, diversos estudos clínicos têm demonstrado que as alternativas atualmente aplicadas como, por exemplo, a administração de alimentação terapêutica, não se mostram suficientes para restaurar completamente a saúde e a microbiota intestinal de indivíduos que apresentaram desnutrição durante a infância (DEWEY; ADU-AFARWUAH, 2008; SMITH et al., 2013; SUBRAMANIAN et al., 2014; YATSUNENKO et al., 2012).

A etiologia da desnutrição deve-se a uma série de elementos inter-relacionados, não sendo levado em consideração apenas ao consumo insuficiente de macro e micronutrientes. Fatores como, por exemplo, alimentos contaminados ou impróprios ao consumo, absorção deficiente devido a infecções recorrentes, funções imunes reduzidas, genótipo do indivíduo e alterações na microbiota intestinal, também se mostram capazes de levar a um quadro de desnutrição (BHUTTA et al., 2008; KAU et al., 2011; ROBERTSON et al., 2019).

Bhutta *et al.* (2008) sugeriram que, mesmo atuando nos 36 países que possuem cerca de 90% dos casos de crianças com crescimento linear reduzido e empregando todas as intervenções recomendadas atualmente pela OMS em 99% dessas crianças, as reduções nas taxas de desnutrição e de mortalidade cairiam para apenas 36% e 25%, respectivamente. Isso indica que ainda existe uma grande necessidade de conhecer a totalidade da etiologia da doença e desenvolver novos protocolos, como a manipulação da microbiota intestinal, como mecanismos de tratar e de prevenir a desnutrição.

A disponibilidade de nutrientes possui um impacto direto na composição e na abundância de taxa microbiana intestinal, resultando em alterações no metabolismo nutricional e, por consequência, modificando as interações imunológicas entre hospedeiro e microrganismo (KAU et al., 2011; KOENIG et al., 2011). Estudos demonstram que a composição da microbiota intestinal de crianças desnutridas é diferente da observada em crianças saudáveis, sugerindo, portanto, alterações no metabolismo e, conseqüentemente, no sistema imune (GHOSH et al., 2014; GUPTA et al., 2011; MONIRA et al., 2011; POP et al., 2014; SUBRAMANIAN et al., 2014; ZHUANG et al., 2019).

Gupta *et al.* (2011) observaram a microbiota intestinal de crianças residentes em zonas urbanas de baixa renda de Kolkata, Índia, que apresentavam ou não desnutrição. Foi

demonstrado uma prevalência das famílias *Campylobacteraceae* e *Helicobacteraceae* nos indivíduos desnutridos, o que sugere uma possível infecção do epitélio intestinal por patógenos pertencentes a essas famílias. Os autores sugerem um ciclo vicioso, no qual a infecção por esses patógenos resultaria em uma má absorção dos nutrientes, levando a um quadro de desnutrição, a qual, por sua vez, proporcionaria um ambiente imunologicamente deprimido que favoreceria a infecção por patógenos. A família *Bacteroidaceae*, que tem sido correlacionado com a redução de peso corporal, também foi observada com maior frequência nas crianças desnutridas. Os indivíduos desnutridos apresentavam um aumento em cerca de 2 vezes na família *Porphyromonadaceae*, a qual só havia sido descrita na microbiota intestinal de pacientes com doença de Crohn, uma doença intestinal inflamatória (MANICHANH et al., 2006).

A influência da desnutrição aguda severa (kwashiorkor) na microbiota intestinal infantil foi estudada em 317 gêmeos do Malawi durante os primeiros 3 anos de vida (SMITH et al., 2013). A causa de kwashiorkor ainda não se encontra bem estabelecida, sugere-se que a microbiota intestinal participa de funções metabólicas essenciais para o crescimento saudável da criança, portanto um quadro de disbiose com infecções recorrentes por patógenos associados a desnutrição resultariam no quadro de kwashiorkor. No estudo, do total dos indivíduos analisados, cerca de 43% se mostraram discordantes no diagnóstico para desnutrição, 7% se mostraram concordantes para desnutrição e 50% concordantes para saudáveis. No caso dos gêmeos discordantes para kwashiorkor, ambos receberam tratamento com alimentação terapêutica pronta para o uso (*ready-to-use therapeutic food – RUTF*) a base de amendoim. Esse estudo também demonstrou que a administração da RUTF resulta em uma maturação transiente da microbiota intestinal, principalmente das funções metabólicas relacionadas aos microrganismos constituintes, porém, quando a alimentação terapêutica era interrompida, a microbiota regressava a apresentar características de imaturidade funcional.

Além disso, para esclarecer se a microbiota intestinal alterada era causa ou consequência do diagnóstico de kwashiorkor, Smith *et al.* (2013) realizaram o transplante da microbiota fecal dos pares de gêmeos discordantes em kwashiorkor para camundongos *germ free*. Foi possível observar que a combinação entre dieta típica do Malawi e a

microbiota kwashiorkor resultava em acentuada perda de peso no camundongo recipiente, além de alterações no metabolismo intermediário, de aminoácidos e de carboidratos. Os microrganismos que apresentaram um aumento significativo nos animais que receberam essa combinação foram o *Bilophila wadsworthia*, um microrganismo consumidor de hidrogênio e redutor de sulfito que possui relação com doenças inflamatórias intestinais e induz uma resposta próinflamatória Th1 em camundongos modelo para essas doenças, e o *Clostridium innocuum*, um simbionte do intestino que age como oportunista em indivíduos imunocomprometidos. Essas alterações foram, novamente, restauradas apenas durante o período de administração da alimentação terapêutica pronta para o uso (RUTF) composta por pasta de amendoim, açúcar, óleo vegetal e leite fortificado com vitaminas e minerais. A introdução de RUTF resultou no aumento de *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp. responsáveis pela produção de bacteriocinas e pelo estímulo do sistema imune inato contra enteropatógenos (FERNANDEZ; BORIS; BARBES, 2003; ITOH et al., 1995; KATOMORI et al., 2010), e *Ruminococcus* sp. que apresentavam características anti-inflamatórias em modelos murinos para colites e cuja ausência está associada ao aumento do risco para doença de Crohn (SOKOL et al., 2008). Outro ponto importante observado foi a redução significativa em Actinobacteria após a introdução de RUTF nas amostras dos indivíduos com kwashiorkor quando comparados com seus gêmeos saudáveis. Dessa forma, Smith *et al.* (2013) relacionam o fenótipo de kwashiorkor com a disbiose dos indivíduos, demonstrando uma influência além do status nutricional.

Subramanian *et al.* (2014) acompanhou crianças provenientes de zonas urbanas de baixa renda de Daca, Bangladesh, durante um período de dois anos e comparou a microbiota intestinal de crianças desnutridas com crianças saudáveis. Nesse estudo, Subramanian *et al.* (2014) determinaram o índice de maturidade relativa da microbiota e o score Z da microbiota por idade (MAZ). Crianças com desnutrição aguda moderada (*moderate acute malnutrition* - MAM) e desnutrição aguda severa (SAM) apresentaram uma baixa maturidade relativa da microbiota e um baixo índice Shannon de diversidade (α -diversidade) quando comparados com controles saudáveis. O mesmo estudo ainda identificou que indivíduos com SAM apresentavam uma depleção de diversos microrganismos relacionados com a maturidade relativa da microbiota. O consumo de RUTF e de tratamento para desnutrição produzido localmente a base de arroz e lentilha não

foi capaz de reverter as diferenças em MAZ e em maturidade de microbiota. Esses efeitos foram observados durante o tratamento para desnutrição e no acompanhamento médico três meses pós-tratamento. A imaturidade da microbiota intestinal também foi observada em crianças que apresentavam diagnósticos menos severos de desnutrição (SMITH et al., 2013; SUBRAMANIAN et al., 2014).

Além dessas diferenças em MAZ e maturidade da microbiota, outros estudos associam a desnutrição com uma microbiota menos diversa, com um baixo número de OTUs (unidade taxonômica operacional – *operational taxonomic unit*), alta presença de Proteobacterias e baixa presença de Bacteroidetes. *Klebsiella* sp. e *Escherichia* sp. foram os gêneros encontrados em maior abundância na microbiota de crianças desnutridas (GHOSH et al., 2014; MONIRA et al., 2011; TIDJANI ALOU et al., 2017).

Outro estudo de corte com crianças desnutridas do Malawi e de Bangladesh mostrou uma correlação entre uma maior abundância de *Acidaminococcus* sp. e uma futura deficiência no score z da estatura por idade (HAZ) (GOUGH et al., 2016). *Acidaminococcus* sp. é capaz de utilizar o glutamato como sua única fonte de carbono e energia. A presença abundante de genes codificando as duas primeiras enzimas da via de fermentação do glutamato também foi associada com uma redução futura no HAZ. Os autores sugerem que esse efeito no crescimento linear da criança causado pelo crescimento exacerbado de *Acidaminococcus* sp. se deve ao fato do glutamato ser importante no metabolismo de amino ácidos, no balanço de nitrogênio e nas funções de barreira do sistema imune.

Ghosh *et al.* (2014) sugerem que o status nutricional de crianças da zona rural da Índia está relacionado, não só com a abundância de microrganismos patogênicos na microbiota intestinal, mas também com a redução de diversos gêneros comensais relacionados com uma influência positiva no status nutricional da criança como, *Roseburia* sp., *Faecalibacterium* sp., *Butyrivibrio* sp., *Eubacterium* sp. e *Phascolarctobacterium* sp.. Os gêneros *Roseburia* sp. e *Butyrivibrio* sp. são conhecidos por produzirem SCFA, a qual é um fator importante para o aumento da captação de carboidratos (GHOSH et al., 2014; TURNBAUGH et al., 2009a). Já os gêneros *Roseburia* sp., *Faecalibacterium* sp. e *Eubacterium* sp. demonstraram propriedades anti-inflamatórias, sugerindo que a redução

dessas populações estaria ligada ao estabelecimento de inflamação e a fase inicial de doenças inflamatórias intestinais (BAJAJ et al., 2012; GHOSH et al., 2014; HAKANSSON; MOLIN, 2011).

Com relação a microbiota associada à desnutrição clínica kwashiorkor em crianças do Senegal e da Nigéria, foram observados uma baixa diversidade β , uma baixa diversidade anaeróbica com depleção em *Methanobrevibacter smithii* e aumento em potenciais patógenos como Proteobacteria, Fusobacteria e *Streptococcus gallolyticus* (TIDJANI ALOU et al., 2017).

Charbonneau *et al.* (2016) analisou a presença de oligossacarídeos no leite materno de mães da região do Malawi, associando com o status nutricional do filho. Os oligossacarídeos não são absorvidos no intestino proximal (ENGFER et al., 2000), mas atuam como probióticos para diversas cepas bacterianas (CHARBONNEAU et al., 2016; GERMAN et al., 2008; HUDA et al., 2014). Foi possível observar que mães de crianças diagnosticadas com desnutrição severa apresentavam significativamente menos oligossacarídeos no leite. Para correlacionar o quadro de desnutrição severa com o consumo reduzido de oligossacarídeos, os autores colonizaram camundongos GF e suínos gnotobióticos com um cultivo microbiano proveniente da microbiota fecal de crianças desnutridas e administraram uma dieta típica do Malawi com ou sem oligossacarídeos sialilados de leite bovino. O consumo dos oligossacarídeos foi associado com alterações na resposta metabólica da microbiota que resultaram em aumento do ganho de massa corpórea magra, alterações na morfologia óssea e alterações no metabolismo do fígado, músculos e cérebro, aumentando a capacidade de utilizar nutrientes para o anabolismo.

1.4 IMPACTO NA MICROBIOTA INTESTINAL DO USO PROFILÁTICO DE ANTIBIÓTICO PARA CASOS DE DESNUTRIÇÃO

O uso de subdoses de antimicrobianos é amplamente difundido na indústria pecuária desde a década de 40, visando o ganho de peso rápido e o aumento da taxa de crescimento de animais destinados ao consumo humano, além da redução da mortalidade e da incidência de infecções (BENGTSSON; GREKO, 2014; HARNED et al., 1948; MOORE et al., 1946; STOKSTAD; JUKES, 1950). A administração de antibióticos de amplo espectro em

fazendas de animais resulta em até 73% de aumento no ganho de peso médio diário (DRITZ et al., 2002; GIANNAKOPOULOS et al., 2001; GOUGH et al., 2014; HIRSCHHORN, 1971; KYRIAKIS et al., 1992; SBIRAKI et al., 2003). Diversos mecanismos de ação dos antibióticos são propostos para justificar essas alterações em ganho de peso em animais, entre eles podemos destacar: a inibição de infecções patogênicas; a redução da carga microbiana e, conseqüentemente, a utilização de nutrientes pela microbiota; a melhoria na capacidade de absorção de nutrientes e calorias pelo epitélio; e, finalmente, a redução na produção de antimetabólitos (substância com estrutura química similar aos metabólitos que compete pelos mesmos sítios de interação) pela microbiota intestinal (MU; ZHU, 2019).

A primeira intervenção no tratamento de crianças desnutridas visando o aumento de peso consiste na administração de suplemento nutricional e na prevenção de diarreia (GOUGH et al., 2014). Porém, os impactos dessa intervenção na restauração do crescimento é modesta, tornando a restauração do crescimento linear um desafio durante os dois primeiros anos de vida e resultando numa taxa de não recuperação de 10 a 15% (BLACK et al., 2013; GOUGH et al., 2014, 2016; VICTORA et al., 2008). Além disso, diversos estudos já demonstraram que crianças desnutridas são mais propensas a infecções, as quais podem estar presentes mesmo sem a existência de sinais clínicos (BABIREKERE-IRISO; MUSOKE; KEKITIINWA, 2006; BERKLEY et al., 2005; FRIEDLAND, 1992; JONES; BERKLEY, 2014; WALSON; BERKLEY, 2018). Com os efeitos benéficos associados ao uso profilático de antibióticos no crescimento e na sobrevivência de animais, a comunidade científica buscou aplicar esses conhecimentos no tratamento da desnutrição infantil. Estudos demonstram que a administração de antibióticos em crianças de países de baixa e média renda resulta em aumento de cerca de 0,04 cm/mês na altura e entre 13 a 50% de ganho no peso ao mês (GUPTA; URRUTIA, 1982; PRENDERGAST; KELLY, 2012; TAHAN et al., 2007). A administração em massa de azitromicina em regiões onde a desnutrição infantil é prevalente também contribuiu para a redução na mortalidade infantil (KEENAN et al., 2018).

A partir dessas observações, a OMS determinou o tratamento profilático para desnutrição severa com cotrimoxazol, antibiótico de amplo espectro composto por 25

mg/kg sulfametoxazol e 5 mg/kg trimetoprim (ORGANIZATION, 1999; WILLIAMS; BERKLEY, 2016). O tratamento com cotrimoxazol é controverso, diversos estudos demonstram a eficácia do antibiótico no combate a infecções, na redução da mortalidade e na readmissão em hospitais para crianças portadoras de HIV ou em casos de desnutrição associada ao HIV (BOURKE et al., 2019; BWAKURA-DANGAREMBIZI et al., 2014; CHINTU et al., 2004; GEBRU; MEKONEN; KIROS, 2020), porém outros relatos demonstram que não há alterações no quadro clínico de crianças desnutridas (ALCOBA et al., 2013; BERKLEY et al., 2016). Um estudo multicêntrico, randomizado e placebo controlado em 4 hospitais no Kenya com crianças entre 60 dias e 5 anos de idade diagnosticadas com SAM não mostrou a eficácia do tratamento com cotrimoxazol por um período de 6 meses na prevenção de mortalidade e morbidade (BERKLEY et al., 2016).

Além disso, o uso de antibióticos pode levar a disbiose da microbiota intestinal, resultando em diferenças nas funções metabólicas dessa comunidade, no aumento da susceptibilidade a colonização e na indução de resistência a antibióticos (RAMIREZ et al., 2020). O perfil da microbiota fecal de crianças tratadas com antibióticos demonstra uma redução na densidade bacteriana total e alterações na composição da população (PALMER et al., 2007). Entretanto, as alterações observadas na microbiota intestinal após o uso de antibióticos estão associadas principalmente com a classe do antibiótico, a dosagem, a via de administração e a duração (IANIRO; TILG; GASBARRINI, 2016). Em adultos, a administração da combinação de meropenem, gentamicina e vancomicina resulta no aumento da abundância de Enterobacteriaceae e outros patobiontes, além da redução de *Bifidobacterium* e outras espécies produtoras de butirato (PALLEJA et al., 2018). Mesmo sendo alterações geralmente temporárias, com duração em torno de 2 meses, flutuações na população microbiana de longo prazo já foram relatadas em adultos saudáveis após o uso de antibióticos (DE LA COCHETIÈRE et al., 2008). A administração oral de ciprofloxacina por um período de 5 dias é capaz de depredar *Bacteroides dorei*, *Akkermansia muciniphila* e *Roseburia* spp., as quais não retornaram a abundância original mesmo após 6 meses da finalização do tratamento (DETHLEFSEN et al., 2008; VONAESCH et al., 2018). Já a administração de vancomicina por 2 semanas foi capaz de aumentar as abundâncias de bactérias patogênicas dos gêneros *Klebsiella* e *Escherichia/Shigella*, sendo que, mesmo após a recuperação dos índices basais de

abundância, cerca de 90% dos microrganismos originais da microbiota desses indivíduos não estavam presentes no novo perfil microbiano (ISAAC et al., 2017). Entretanto, o uso de antibiótico é capaz de levar a um aumento na carga bacteriana logo após a sua administração (PANDA et al., 2014). Panda et al. (2014) demonstraram que o uso de β -lactâmicos durante um período de 7 dias leva ao aumento em até 2 vezes da carga microbiana em amostras fecais, incluindo um aumento na razão de Bacteroidetes e Firmicutes.

O uso de cotrimoxazol é amplamente estudado em crianças expostas ou positivas para o HIV, podendo essas apresentarem ou não desnutrição (BOURKE et al., 2019; D'SOUZA et al., 2020). Entretanto, até o momento não há relatos da associação entre desnutrição, profilaxia com cotrimoxazol e microbiota intestinal. Bourke *et al.* (2019) demonstraram que o tratamento com cotrimoxazol em conjunto com a terapia antirretroviral em crianças da África subsaariana reduz a inflamação sistêmica através de alterações na microbiota intestinal e na atuação direta em leucócitos e em células epiteliais do intestino. Esse estudo apontou redução na abundância de *Streptococcus* do grupo viridans em crianças que fizeram o uso de antibiótico. *Streptococcus* do grupo viridans já foram identificados em grande abundância na microbiota intestinal de crianças com *stunting* da África subsaariana (VONAESCH et al., 2018).

As grandes diferenças observadas na composição da microbiota intestinal após o uso de antibióticos podem também resultar em importantes diferenças funcionais no metaboloma do hospedeiro, sendo que diversas alterações induzidas por antibióticos na microbiota comensal são correlacionadas com doenças como diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares, esteatose hepática, doenças inflamatórias intestinais, entre outras (MU; ZHU, 2019; RIBEIRO et al., 2020a). Um exemplo é a depleção de bactérias Gram-positivas pelo uso de vancomicina, reduzindo a fermentação de carboidratos em camundongos e levando ao aumento de oligossacarídeos não fermentados nas fezes e a redução de SCFA, incluindo acetato, butirato, propionato e lactato (YAP et al., 2008). Em camundongos C57BL/6J jovens, a administração de baixas doses de antibióticos resultou em aumento da adiposidade e de hormônios relacionados com os metabolismos de carboidratos, lipídeos e colesterol (CHO et al., 2012). Além disso, o uso de vancomicina-

imipenem em camundongos C57BL/6 fêmeas foi associado com o aumento de arabinitol e de açúcar nas fezes, principalmente como consequência da redução de *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* que são responsáveis pela conversão de arabinitol em açúcares pentose (CHOO et al., 2017). Choo *et al.* (2017) também observaram uma redução nos níveis de arginina, precursor de diversos componentes imunomodulatórios. Mesmo o metaboloma apresentando grande importância para o correto funcionamento do organismo, estudos sobre a influência do uso de antibióticos em relação ao metabolismo da microbiota intestinal ainda são escassos na literatura.

1.5 MUDANÇAS DA RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA COMO CONSEQUÊNCIAS DA DISBIOSE E ALTERAÇÕES NUTRICIONAIS

A pré-disposição de contrair infecções vista em indivíduos com deficiência em nutrientes está sendo diretamente relacionada com as alterações observadas na fisiologia e nas funções dos órgãos e das células do sistema imune. Essas alterações geralmente podem resultar em defeitos na resposta imune inata e adaptativa, danos na barreira epitelial e perda de função das células-tronco epiteliais intestinais (FISCHER et al., 2017; HUGHES et al., 2009; IYER et al., 2012; RYTTER et al., 2014; STEEVELS et al., 2010).

Com relação a mucosa gastrointestinal, observa-se, em indivíduos desnutridos, um comprometimento da sua integridade física agindo em conjunto com redução da secreção de ácido gástrico, características que promovem aumento da susceptibilidade a patógenos (MARTINSEN; BERGH; WALDUM, 2005). Dietas deficientes em proteínas, zinco, vitaminas e/ou folato resultam em alterações diretas sobre as células do epitélio intestinal, uma vez que essas necessitam de uma alta disponibilidade de nutrientes devido sua alta taxa de proliferação celular e replicação do DNA (PRENDERGAST; KELLY, 2012). Além disso, a presença marcante de doenças como, por exemplo, a disfunção entérica ambiental e a enteropatia ambiental, em regiões de condições sanitárias precárias também vem sendo relacionada com a quebra da barreira gastrointestinal devido à presença constante de patógenos e/ou a disbiose da microbiota, o que resulta na atrofia das vilosidades, hiperplasia moderada ou severa das criptas intestinais, infiltração crônica de células inflamatórias, aumento da permeabilidade do epitélio e perda do tecido linfóide associado ao intestino (*gut associated lymphoid tissue* - GALT) (IBRAHIM et al., 2017; MAJO et al.,

2013). A quebra da barreira epitelial do intestino ainda resulta na translocação microbiana (exemplo, CD14 solúvel no soro utilizado como marcador de ativação de monócitos e macrófagos em resposta ao estímulo por lipopolissacarídeo) e no aumento de marcadores de inflamação (exemplo, calprotectina fecal, neopterinina e mieloperoxidase) (MONDAL et al., 2012; PANEL., 2016; PRENDERGAST et al., 2014).

Além das alterações fisiológicas observadas no GALT, crianças com desnutrição também apresentam reduções no número de células positivas para IgA (imunoglobulina A) na mucosa do intestino e nos níveis de IgA secretora nos fluidos intestinais, na saliva, nas secreções nasais e nas secreções lacrimais (GREEN; HEYWORTH, 1980; REDDY; RAGHURAMULU; BHASKARAM, 1976). Entretanto, essa redução não é observada nos demais subtipos de imunoglobulinas (GREEN; HEYWORTH, 1980).

Brown *et al.* (2015) constataram que apenas a redução de proteínas e gorduras da dieta de camundongos não é capaz de causar alterações na estrutura da mucosa do intestino delgado, sendo necessária a associação da deficiência nutricional com alterações na microbiota, como foi demonstrado com a gavagem de espécies de *Bacteroidales* e de *E. coli* nesses animais. Além disso, foi observado um aumento no número de linfócitos intraepiteliais (IEL), principalmente de células T $\gamma\delta$ CD8⁺, no duodeno de camundongos desnutridos expostos ou não a *Bacteroidales* e *E. coli*. Os IEL coletados do duodeno desses camundongos apresentavam níveis elevados do fator de necrose tumoral α (*tumor necrosis factor α* – TNF- α) e do interferon γ (IFN- γ).

Um estudo realizado em Gambia com crianças desnutridas que apresentavam enteropatia e baixo crescimento também corrobora com os dados encontrados por Brown *et al.* (2015) (CAMPBELL et al., 2003). No estudo de Campbell *et al.* (2003) foi demonstrado uma redução na população de células B e um aumento no número de células T, novamente as células T $\gamma\delta$ CD8⁺ apresentaram um aumento elevado em crianças desnutridas quando comparadas com o grupo controle de crianças saudáveis do Reino Unido. O padrão de produção de citocinas observado nessas crianças desnutridas também foi alterado, tendendo a uma resposta pró-inflamatória (com aumento de TNF- α e IFN- γ), com uma redução progressiva da expressão do fator de crescimento transformante β (*transforming growth factor- β* – TGF- β) conforme o status nutricional do indivíduo. Os autores sugerem que, em

crianças com marasmo de Gambia, se estabeleça um círculo vicioso, no qual os patógenos quebram as barreiras de defesa da mucosa, levando a uma dominância de IFN- γ sobre TGF- β e, conseqüentemente, a manutenção da ruptura epitelial e da internalização de antígenos sensibilizantes.

Fló *et al.* (1996) demonstraram que a desnutrição de ratos durante o período de aleitamento leva a uma redução tanto na porcentagem de precursores de células B na medula óssea quanto na de células B maduras na periferia. O estudo mostrou que a desnutrição durante o aleitamento não foi capaz de alterar a proporção de células T CD4⁺CD8⁺ no GALT, o que indica que não houve liberação de timócitos corticais. Essa retenção de timócitos no timo também pode ser explicada pela redução de células T CD4⁺Thy-1⁺ no desmame dos animais desnutridos. A concentração do antígeno Thy1 é elevada em progenitores de células B, pró-timócitos e timócitos ratos. Além disso, ratos adultos apresentam uma população reduzida de linfócitos T Thy-1⁺ periféricos, sendo que essa população é considerada como ou células recém migradas do timo ou descendentes diretos dessas células. Portanto, a redução ainda maior de células T CD4⁺Thy-1⁺ nas placas de Peyer e nos linfonodos mesentéricos de ratos desnutridos durante o aleitamento, sugere que o timo desses animais está liberando um número reduzido de células T CD4⁺ quando comparados com os animais controle saudáveis. Quando os animais foram imunizados com toxina colérica pela via mucosa intraplacas de Peyer uma semana após o reestabelecimento de uma dieta apropriada, houve uma diminuição de células formadoras de anticorpos IgG, IgA e IgM específicos contra o antígeno nas placas de Peyer, nos linfonodos mesentéricos e no baço. Esses animais também apresentavam baixos níveis de anticorpos específicos no soro e nas fluidos intestinais. Os níveis de anticorpos desses animais desnutridos só se mostraram equivalentes aos dos animais controles quando foi permitido um período de três semanas de reintrodução alimentar antes da administração da vacina (FLÓ *et al.*, 1996).

Mello *et al.* (2014) demonstraram que camundongos submetidos a dieta deficiente em proteínas não apresentavam alterações na produção de IFN- γ e IL-5 (interleucina 5), porém houve redução na produção de citocinas IL-2, aumento de IL-10, aumento da expressão de STAT-3 e, concomitantemente, redução na expressão de STAT-1. Ambos são importantes fatores de transcrição envolvidos na resposta imune e nas vias inflamatórias.

STAT-1 é essencial para a sinalização intracelular induzida por resposta ao estímulo de IFN- γ , fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) ou IL-6, sua função está associada com a modulação da expressão de MHC de classe II (complexo principal de histocompatibilidade de classe II - *major histocompatibility complex*) e B7-2 e com a produção de óxido nítrico (NO) (BARIS et al., 2016; MELLO et al., 2014). Já o STAT-3, que também é ativado a partir do estímulo produzido por membros da família do IFN (IL-10, IFN- γ e IFN- α), IL-2 e pela interação ligante-receptor de vários receptores tirosina quinase, tem como função a mediação da interação de genes relacionados com o processo de crescimento celular e apoptose, apresenta papel fundamental na diferenciação para células Th17 e tem sua atuação também relacionada com infecções virais, nas quais sugere-se uma participação na geração de células Th foliculares (MATSUDA et al., 1999; YANG et al., 2007; YUAN et al., 2004). Sabendo da importância desses fatores de transcrição para a resposta imune, é possível supor que crianças desnutridas vão apresentar alterações na maneira como o sistema imune monta uma resposta e na intensidade dessa resposta frente a um quadro de infecção (IBRAHIM et al., 2017; MELLO et al., 2014).

Hughes *et al.* (2009) avaliaram a função das células dendríticas em crianças com idade entre 1 e 5 anos e que apresentavam desnutrição severa no Zâmbia. O estudo foi o primeiro a demonstrar uma redução no número de DC em crianças com desnutrição, além da recuperação dessa deficiência com a aplicação de tratamento recomendado pela OMS, o qual inclui a administração de vitamina A, antibióticos (penicilina e gentamicina), medicação antimalárica e anti-helmíntica, e fórmula alimentícia F75 (75 quilogramas por 100 ml de leite), aumentando o consumo de calorias conforme o quadro clínico fosse estabilizado. Além disso, foi observado, em cerca de 17% dos pacientes em estudo, uma falha na maturação de DC, na qual há a redução nos níveis de expressão de HLA-DR e alta produção de IL-10. Essas DCs anérgicas não são capazes de oferecer suporte a proliferação das células T.

Camundongos em estado de inanição também demonstram uma redução significativa no número total de DCs derivadas de órgãos linfáticos (baço) e não linfáticos (fígado), além de alterações na capacidade proliferativa dessa população celular (ABE et al.,

2003). DCs encontradas no fígado desses animais em inanição não promovem a proliferação de linfócitos de memória antígeno-específicos contra o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), não induzem a produção de IFN- γ após estímulo com HBsAg e apresentam uma redução significativa na produção de IL-2, sendo essa última essencial para a defesa do indivíduo contra infecções intracelulares através da estimulação tanto do sistema imune inato quanto das células efetoras do sistema imune adaptativo (ABE et al., 2003; SCOTT, 1993). Entretanto, a inanição não afetou a capacidade fagocítica das DCs e não alterou a expressão de moléculas do MHC de classe II e de CD86, responsável pelo sinal coestimulatório para ativação e sobrevivência de células T (ABE et al., 2003).

Niiya *et al.* (2007) avaliaram a resposta imune antígeno-específica em camundongos com PEM através da análise da funcionalidade de DCs em resposta a vacina contra hepatite B contendo o HBsAg (NIIYA et al., 2007). Os animais com PEM demonstraram uma baixa resposta a imunização contra a hepatite B, ao contrário do que foi demonstrado nos animais controle que apresentavam tanto anticorpos no soro contra o HBsAg quanto linfócitos HBsAg-específicos no baço. Mesmo não tendo sido encontradas diferenças na proliferação de linfócitos em resposta a estímulos com mitógenos policlonais nos animais com restrições de dieta, a contagem total de linfócitos nesses animais era de cerca de 25% do valor encontrado nos animais controle. Com relação a população de DCs, essas células demonstraram uma deficiência na estimulação de linfócitos de memória HBsAg-específicos e uma redução na produção de IL-12p70 e IFN- γ , corroborando assim com os dados encontrados por Abe *et al.* (2003).

Levando em consideração o sistema imune adaptativo de indivíduos com desnutrição, mesmo não sendo observadas alterações nos números de células T CD4⁺ e CD8⁺ periféricas (NAJERA et al., 2004), podemos destacar uma redução nos números de células T de memória CD8⁺ CD45RO⁺ (NÁJERA et al., 2001), além da redução nas populações de células T efetoras CD4⁺ CD62L⁻ e CD8⁺ CD28⁻ (NÁJERA et al., 2007). Os fenótipos CD62L⁻ e CD28⁻ estão associados com as funções citolíticas das células T, possuindo um papel importante durante o controle de infecções (GONDOIS-REY et al., 2006; NÁJERA et al., 2007; SCHILBACH, 2005). A redução dessas populações indica

uma possível inefetividade do sistema de células T ativadas por antígenos em crianças desnutridas (NÁJERA et al., 2007).

Com relação a capacidade de produção de citocinas por células T CD4⁺ e CD8⁺ do sangue periférico em crianças desnutridas, Rodríguez *et al.* (2005) demonstraram que essas populações apresentavam um aumento na produção de IL-4 e IL-10 e redução na produção de IL-2 e IFN- γ . Outros trabalhos relacionaram a redução de células produtoras de IL-2 principalmente com o declínio na proporção de células CD45RO⁺ produtoras de IL-2 (BRICHARD et al., 2001; CHALMERS et al., 1998). Portanto, os autores sugerem uma possível redução na população de células CD45RO⁺ produtoras de IL-2 durante um quadro de desnutrição, já que o próprio grupo havia demonstrado no trabalho de Nájera *et al.* (2001) que crianças desnutridas apresentam redução na população de células CD45RO⁺. Além disso, quando avaliados marcadores de ativação, CD69 e CD25, foi observado que essas populações apresentavam um redução nos seus níveis, sugerindo uma capacidade de ativação alterada (RODRIGUEZ et al., 2005).

Badr *et al.* (2011) analisaram células T de crianças egípcias desnutridas, levando em consideração as moléculas funcionais, a produção de citocinas e a apoptose dessas células. Nessas crianças foram observados tanto uma redução nos níveis de IL-2 e IL-7 circulantes quanto um aumento nos níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α . Alterações nos níveis de citocinas podem contribuir para o agravamento do quadro de desnutrição desses indivíduos, um exemplo disso é o aumento de TNF- α , o qual é capaz de induzir a anorexia e a caquexia em animais e humanos (TISDALE, 2001). Além disso, houve uma redução na população de células T CD3⁺ e um aumento de células T em apoptose (BADR et al., 2011). Esse aumento na apoptose pode estar relacionado com a redução tanto de IL-7 circulante quanto de CD127 (IL-7 receptor α – IL-7R α) nas células T. A ligação de IL-7 com o receptor IL-7R α resulta no aumento de moléculas anti-apoptóticas, como o Bcl-2, e no aprimoramento da sinalização mediada por receptor de células T (*T cell receptor* – TCR). O IL-7R α é suprimido da parede celular de células T ativadas por IL-7 (PARK et al., 2004), porém é logo reestabelecido pela síntese de novo de proteínas (SASSON et al., 2006). Entretanto, a síntese proteica de novo é deficiente em crianças desnutridas, o que resulta nos baixos níveis de CD127, na redução de moléculas anti-apoptóticas e, conseqüentemente, no

aumento da apoptose (BADR et al., 2011). O estudo ainda demonstrou que os linfócitos T de crianças desnutridas apresentavam baixos níveis dos receptores CXCR4 e CCR7 de quimiocinas inflamatórias, sendo correlacionados com uma redução significativa na capacidade migratória dessas células.

Para avaliar a resposta imune frente a vacinas de DNA durante um quadro de desnutrição, Sakai *et al.* (2006) imunizaram, através da técnica de biobalística, camundongos em dieta restrita de caseína com plasmídeo expressando ovalbumina (OVA). Nesses animais, a porcentagem de células T CD8⁺ OVA-específicas se mostrou reduzida quando comparada com o grupo controle. Além disso, células T CD4⁺ apresentaram uma baixa produção de IL-2. Entretanto, a resposta de anticorpos OVA-específicos não sofreu alterações. Os dados sugerem que a resposta a vacinas de DNA em um indivíduo desnutrido leva a alterações na resposta de células T, mas não na resposta de célula B.

Steevels *et al.* (2010) avaliaram a polarização no perfil de citocinas de células T de memória e efetoras, utilizando IFN- γ para avaliar um perfil Th1 e IL-4 para um perfil Th2, comparando diferentes tipos de dieta em camundongos recém-desmamados: dieta completa, dieta isocalórica baixa em proteínas e restrição na ingestão de alimentos por 14 dias. O grupo com restrição alimentar apresentou redução na produção de IFN- γ e aumento na produção de IL-4 durante estimulação *in vitro* com anti-CD3. Já, após desafio com anti-CD3 *in vivo*, esse mesmo grupo demonstrou o aumento em IFN- γ , porém os níveis de IL-4 permaneceram estáveis. O grupo que recebeu dieta com redução em proteína não apresentou alterações nos níveis de IFN- γ de IL-4. Esse perfil só foi alterado quando restrição alimentar passou de 14 dias para 26 dias, apresentando uma redução nos níveis de IFN- γ no soro após o desafio com anti-CD3.

Com relação a resposta de células B, estudos apontam que sua funcionalidade geral permanece inalterada durante um diagnóstico de PEM, sendo que algumas alterações podem ser observadas na resposta imune mediada por anticorpos (IBRAHIM et al., 2017; SAKAI et al., 2006). Camundongos desnutridos apresentam aumento nos níveis de imunoglobulinas IgG1 e IgE (perfil Th2) no soro, porém os níveis de IgG2a e IgG3 (perfil Th1) não sofre alteração (NEYESTANI; WOODWARD, 2005). Essas informações sugerem uma polarização para uma resposta imune do tipo Th2, já que citocinas com um

perfil Th1 são responsáveis por induzir a produção de imunoglobulinas que fazem opsonização e que fazem a ligação as moléculas do complemento e citocinas com um perfil Th2 estimulam a produção de imunoglobulinas relacionadas com a proteção de ambientes extracelulares (NEYESTANI; WOODWARD, 2005; SZABO et al., 2003). Reddy *et al.* (1976) demonstraram que crianças com marasmo e kwashiorkor apresentam uma redução significativa nos níveis de IgA em fluidos do duodeno, na saliva, nas secreções nasais e nas secreções lacrimais. A redução no número de células plasmáticas IgA⁺ na lâmina própria do íleo de ratos com deficiência em vitamina A foi demonstrada por Bjersing *et al.* (2002). Além disso, foram observadas reduções nos números de células CD4⁺ nas regiões parafoliculares das placas de Peyer e nos números de linfócitos positivos para a cadeia alfa do receptor de IL-2 (BJERSING et al., 2002).

Essas alterações descritas na barreira da mucosa gastrointestinal e nas funções do sistema imune sugerem que, quando crianças desnutridas recebessem as vacinas obrigatórias, as mesmas apresentariam uma eficácia comprometida e, conseqüentemente, a geração de uma resposta imune inadequada para assegurar a proteção desses indivíduos, o que é visto com vacinas para a poliomielite, o rotavírus e a cólera (ARMAH et al., 2010; GENTON; CANI; SCHRENZEL, 2015; IBRAHIM et al., 2017; LEVINE, 2010; PEREZ-SCHAEL et al., 2007; VLASOVA et al., 2019; ZAMAN et al., 2010).

Além da influência direta no sistema imune, a desnutrição pode resultar em alterações no microbioma intestinal de indivíduos acometidos, o que, por sua vez, pode resultar no agravamento de imunodeficiências. Como citado anteriormente, o intestino abriga trilhões de microrganismos sob uma condição de simbiose que exerce um papel vital na saúde e doença do indivíduo, sendo que essa comunidade microbiana sofre grandes influências por fatores como a idade, o gênero, a dieta e os estímulos ambientais (FERREIRA; ANTUNES; FINLAY, 2010; IBRAHIM et al., 2017; IHEKWEAZU; VERSALOVIC, 2018; VENTURA et al., 2012). A microbiota desempenha uma função essencial na manutenção da homeostase de mamíferos, com participação na disponibilidade de nutrientes essenciais, na metabolização de fibras da dieta em SCFAs e no correto desenvolvimento do sistema imune (IHEKWEAZU; VERSALOVIC, 2018; ROUND; MAZMANIAN, 2009).

Levando em consideração os dados apresentados anteriormente mostrando a relação entre a microbiota e o sistema imune e entre a microbiota e a desnutrição infantil, podemos supor que o quadro de disbiose observado durante a desnutrição promove alterações nas funções do sistema imune, resultando em um maior risco a infecções e uma redução na eficácia de vacinas. Entretanto, até o momento poucos trabalhos se propuseram a avaliar a interação entre desnutrição, microbiota e sistema imune (GALDEANO et al., 2011; MIYAZAKI et al., 2018; NÚÑEZ et al., 2013). Além disso, exerce funções de restrição ou mesmo de eliminação de microrganismos patogênicos, função conhecida como “colonization resistance” (IGNACIO et al., 2019).

Trabalhos que visam estabelecer a relação entre a desnutrição, a microbiota e o sistema imune, são geralmente voltados para a avaliação de probióticos, limitando a correlação dessa complexa rede apenas com microrganismos específicos. Galdeano *et al.* (2011) buscaram elucidar os efeitos de um leite fermentado com potencial probiótico contendo *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus casei*, como complemento para as terapias alimentares durante a desnutrição, avaliando a barreira intestinal e as funções do sistema imune de mucosa e sistêmico em modelos murinos para a desnutrição proteica-energética não severa. A suplementação com o leite fermentado probiótico mostrou-se eficaz em estimular o sistema imune dos animais desnutridos, levando a um aumento do número de células IgA⁺, macrófagos e DC. A produção de citocinas (IFN- γ , TNF- α e IL-2) e a atividade fagocítica dessas células no peritônio e no baço encontrava-se elevada nos animais que receberam a suplementação com leite fermentado. Além disso, frente a imunização com OVA, os animais suplementados foram capazes de estimular uma resposta sistêmica contra o antígeno. Já analisando a capacidade de responder contra uma infecção por *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, observou-se uma melhora na resposta do hospedeiro contra a infecção, resultando em uma menor expansão da bactéria para o fígado e o baço.

Núñez *et al.* (2013) avaliaram o efeito da mesma formulação de leite fermentado probiótico citada anteriormente no timo de camundongos com desnutrição proteica-energética não severa. Novamente, a suplementação alimentar com o leite fermentado apresentou melhorias na histologia do timo, redução na apoptose e aumento na

porcentagem de timócitos positivos únicos para CD4⁺/CD8⁻. Nos camundongos controles desnutridos que não receberam suplementação alimentar, observou-se um aumento de timócitos duplo-positivos imaturos. Nesse estudo não foram observadas diferenças nos números de macrófagos e DC no timo entre os grupos desnutridos e saudáveis. Com relação a produção de citocinas, IFN- γ e IL-2 apresentaram níveis mais elevados no grupo que recebeu a suplementação. Entretanto, só o fator desnutrição já foi responsável pelo aumento nos níveis de IFN- γ .

As vacinas orais contra o rotavírus, o poliovírus, a cólera e a shigelose apresentam uma menor eficácia em crianças provenientes de regiões com média e baixa renda do que crianças de regiões de maior status socioeconômico (GILMARTIN; PETRI, 2015b; TWITCHELL et al., 2016). A eficácia das duas vacinas comerciais contra o rotavírus (RotaTeq[®] e Rotarix[®]) se encontra na faixa de 50% a 60% em países de renda baixa e média enquanto, em países de alta renda, a eficácia se encontra entre 80% a 90% (GILMARTIN; PETRI, 2015a). Uma das possíveis causas dessa baixa eficácia observada é a disfunção entérica ambiental que consiste em uma desordem estrutural e funcional do intestino delgado frequentemente observada em crianças de países de baixa renda (ALI; IQBAL; SADIQ, 2016).

Twitchell *et al.* (2016) criaram um suíno gnotobiótico modelo para disbiose entérica humana para avaliar o efeito da microbiota intestinal humana na resposta imune contra uma vacina rotavírus humana atenuada. Os animais receberam transplante de matéria fecal de uma criança da Nicarágua com evidência de inflamação e permeabilidade intestinal e sem soroconversão após vacinação contra o rotavírus. Suínos transplantados com microbiota saudável apresentaram um maior número de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ específicas contra o rotavírus no íleo, baço e sangue do que em suínos transplantados com matéria fecal não saudável. Os animais saudáveis também apresentaram sinais clínicos menos severos e uma redução na eliminação de rotavírus nas fezes, quando comparados com os animais não saudáveis. Com relação a microbiota, após a vacinação e o desafio, foram observadas reduções na diversidade α dos animais saudáveis, demonstrando que a própria presença do vírus foi capaz de levar a um desequilíbrio. Durante o estudo, foi observada a correlação positiva entre a presença de *Collinsella* sp. e o aumento de células T

CD8⁺ no sangue e no íleo e células T CD4⁺ no sangue. Além disso, uma correlação negativa foi estabelecida entre a presença de *Clostridium* sp. e *Anaerococcus* sp. e a frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ no íleo.

Fischer *et al.* (2017) estabeleceram um modelo suíno gnotobiótico transplantado com microbiota intestinal infantil humana saudável para elucidar o papel da desnutrição, da microbiota e do sistema imune durante a infecção e na proteção contra o rotavírus humano. Nos suínos desnutridos houve uma redução nos títulos de anticorpos específicos contra o rotavírus e na concentração de IgA total, além de redução nas frequências sistêmicas de linfócitos Th e T citotóxicos e nos níveis séricos de triptofano e de enzima 2 conversora de angiotensina 1 (*angiotensin I-converting enzyme 2* – ACE2). Outro estudo em camundongo *knockout* para a ACE2 havia demonstrado que esses animais apresentavam susceptibilidade a inflamação intestinal e colites, redução nos níveis de triptofano sérico e alteração na microbiota intestinal, sendo que a suplementação com triptofano foi capaz de reduzir a inflamação, aumentar a produção de peptídeos antimicrobianos pelo epitélio intestinal e ecologia microbiana do intestino (HASHIMOTO *et al.*, 2012). No estudo de Fischer *et al.* (2017), a suplementação de triptofano foi capaz de aumentar as frequências de células T regulatórias em animais tanto desnutridos quanto saudáveis.

Miyazaki *et al.* (2018) analisaram a eficácia da vacina oral atenuada para rotavírus em suínos GF que apresentavam ou não deficiência proteica, além de avaliar a eficácia da vacina na microbiota intestinal infantil humana saudável, através da transferência de microbiota fecal (MIYAZAKI *et al.*, 2018). Nesse estudo foi possível observar que, em suínos com deficiência proteica, a taxa de proteção contra diarreia foi reduzida após o desafio com rotavírus humano virulento, além de uma maior disseminação do vírus pelas fezes desses animais. Essa baixa eficácia observada foi associada com a alteração dos níveis séricos de IFN- α , TNF- α , IL-12 e IFN- γ em resposta a vacinação, além da supressão do sistema imune inato e células T produtoras de IFN- γ . Além disso, nos animais deficientes em proteínas que receberam transplante de matéria fecal, foram observadas reduções na função citotóxica das células NK, nos números de células mononucleares no baço e nos números de DC plasmocitoides no baço, no íleo e no duodeno desses animais após o desafio.

A eficácia a vacinação vem se mostrando alterada, principalmente quando comparada a eficácia em países desenvolvidos com países em desenvolvimento (VALDEZ; BROWN; FINLAY, 2014). Portanto, a compreensão entre a relação nutrição, microbiota intestinal e sistema imune pode favorecer a redução da prevalência de doenças infecciosas em regiões menos favorecidas economicamente, reduzindo custos com medidas paliativas.

1.6 A VACINA CONTRA O VÍRUS VARICELA-ZOSTER COMO MODELO BIOLÓGICO PARA ANALISAR A INTERAÇÃO MICROBIOMA, DESNUTRIÇÃO E SISTEMA IMUNE

O vírus varicela-zoster (*varicella-zoster virus* - VZV), também conhecido como herpesvírus humano tipo 3, é um vírus de fita dupla de DNA e pertence a mesma família dos oito herpesvírus humano, classificado na subfamília *Alphaherpervirinae* gênero *Varicellovirus*, é o agente causador da catapora, principalmente na infância e adolescência, e do herpes zoster, visto principalmente em adultos e idosos (ARVIN, 2001; CHIU; LAU, 2005; HABERTHUR; MESSAOUDI, 2013). O VZV é um vírus neurotrópico, ou seja, apresenta tropismo pelo sistema nervoso, estabelecendo uma infecção latente nos gânglios sensoriais (HABERTHUR; MESSAOUDI, 2013). Além dos gânglios sensoriais, o VZV também exibe tropismo pelos linfócitos T, nos quais causa viremia, e por células da pele (ARVIN, 2001). Sua estrutura é similar aos demais herpesvírus, apresentando núcleo, nucleocapsídeo, tegumento e envelope. O núcleo é caracterizado pela presença de uma estrutura formada por fibras soltas envolvendo uma região densa cilíndrica de DNA, sendo que toda essa estrutura é envolta pelo nucleocapsídeo (HABERTHUR; MESSAOUDI, 2013; PUVION-DUTILLEUL et al., 1987). O tegumento é a camada proteica sem estrutura definida que envolve o nucleocapsídeo, o separando do envelope, além disso, essa região reúne uma variedade de proteínas virais que podem estar relacionadas com a modulação do ambiente no hospedeiro a fim de favorecer as necessidades do vírus (HABERTHUR; MESSAOUDI, 2013). O envelope é derivado de fragmentos de membranas celulares alteradas, contendo diversas glicoproteínas (COOK; STEVENS, 1970). O genoma do VZV é o menor entre os herpesvírus humanos, com aproximadamente 125 kb, que codifica para 71 regiões de leitura aberta (*open reading frames* – ORFs) únicas (DUNCAN; HAMBLETON, 2015; SCOTT; DAIVSON, 1986).

A varicela raramente induz complicações em crianças imunocompetentes, sendo que os casos de morte infantil se encontram dentro da faixa de 0,1 mortes a cada 100.000 casos mundialmente segundo dados de 2010 da OMS (CHIU; LAU, 2005; PREBLUD, 1986; WHO, 2014). As infecções bacterianas secundárias por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* do grupo A e as alterações neurológicas, como a encefalite e ataxia cerebelar, são as complicações mais importantes observadas na infecção por varicela (CHIU; LAU, 2005). Segundo o Ministério da Saúde, o Brasil apresentou 602.136 casos de varicela durante o período de 2012 a 2017, sendo que 33% dos casos foram notificados na região sul do país, seguido pela região sudeste com 31,4%. Além disso, as crianças com idade entre 1 a 4 anos apresentaram o maior número de casos (37,7%) e o menor número registrado foi entre pessoas com idade superior a 50 anos (0,68%) (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; SAÚDE, 2009). Entretanto, o número de internações hospitalares decorrente a varicela foi maior nos idosos do em relação as outras faixas etárias, compreendendo cerca de 24,1% das 38.612 internações registradas. O número de óbitos decorrente a varicela, com e sem complicações secundárias, foi de 649 casos, registro extremamente superior ao esperado para a doença (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; SAÚDE, 2009).

A vacina atenuada viva foi introduzida com o intuito de prevenir a infecção primária por VZV, sendo gerada através de passagens seriais em fibroblastos embrionários de cobaias e em células diploides humanas de um isolado clínico proveniente do Japão, a cepa Oka (CHIU; LAU, 2005; ZERBONI et al., 2005). Varilrix é a vacina VZV atenuada constituída pela cepa Oka e utilizada na prevenção da varicela em crianças e adultos saudáveis ou imunocomprometidos (CHIU; LAU, 2005).

A infecção por VZV ainda não está totalmente elucidada, acredita-se que ela ocorra através da inalação de gotículas respiratórias carregadas de vírus, virions transportados pelo ar provenientes de lesões cutâneas de varicela ou pelo contato com fluídos infectados (HABERTHUR; MESSAOUDI, 2013; SUZUKI et al., 2004). O modelo de infecção do VZV é proposto com uma infecção inicial das células dendríticas presentes no epitélio da mucosa, as quais transportam o vírus para os linfonodos ou as amígdalas, possibilitando a transferência do VZV para as células T (ABENDROTH et al., 2001; KU et al., 2005b; MORROW et al., 2003). Essa viremia inicial ocorre durante os primeiros 4-6 dias de

infecção na região dos linfonodos e amígdalas (CHIU; LAU, 2005). O vírus é então replicado no fígado e no baço, possivelmente em outros órgãos também, levando a segunda viremia entre os dias 10-14 de infecção e as erupções vesiculares na pele características da doença. Após a primeira infecção, o vírus migra para os gânglios sensoriais, onde permanece latente durante a vida do indivíduo (CHIU; LAU, 2005). Durante quadros de baixa imunidade celular ou de imunossupressão ao decorrer da vida, o vírus é reativado e causa a doença conhecida como herpes zoster, caracterizada por erupções dolorosas na pele (CHIU; LAU, 2005).

A inoculação de VZV em animais de pequeno porte, como coelhos, cobaia, camundongos e ratos, levam a soroconversão sem a presença de sinais clínicos, sendo que o DNA viral é detectado nos neurônios ganglionares e em células não neuronais (ARVIN; GERSHON, 1996; MYERS; DUER; HAUSLER, 1980; WROBLEWSKA et al., 1993; ZERBONI et al., 2005). A geração de um modelo experimental murino humanizado com imunodeficiência combinada severa (SCID-hu) permitiu uma maior compreensão da patogênese do VZV, nesses animais foi realizada ou a introdução de um implante conjunto de tecido de fígado e timo fetal humano abaixo da capsula do rim do animal ou a introdução de um enxerto de pele humana na região subcutânea do animal (KU et al., 2005).

A resposta imune frente a infecção primária de VZV é caracterizada por um aumento de interferon do tipo 1 circulante (IFN- α/β), consequência do influxo de células dendríticas plasmocitóides para as regiões de lesão na pele (ARVIN et al., 1986a; HUCH et al., 2010; KU et al., 2004). Além da resposta de IFN- α/β , linfócitos NK são recrutados como resposta inicial a infecção. O VZV é capaz de reduzir a expressão de MHC de classe I e II das células infectadas, moléculas necessárias para o reconhecimento por células T CD4 e CD8, entretanto, esse mecanismo torna a célula infectada em um alvo para as células NK presentes no sangue periférico (COHEN, 1998; DUNCAN; HAMBLETON, 2015; KU et al., 2005). A detecção de células T CD4⁺ e CD8⁺ VZV-específicas, principalmente as células T TCR $\alpha\beta$ ⁺, coincidem com o final da formação das erupções cutâneas, sendo que crianças com baixos números de células T CD4⁺ ou com deficiência genética em células T TCR $\alpha\beta$ ⁺ tardam a controlar a infecção primária de VZV (ARVIN et al., 1986b; JURA et al., 1989; MORGAN et al., 2011). Com relação as células B, não é observada nenhuma

alteração na susceptibilidade ao VZV em casos nos quais há uma depleção dessa população celular (HABERTHUR et al., 2011), além de não ter sido observadas correlações entre a presença de IgG VZV-específica e a severidade da doença (ARVIN et al., 1986b). A resposta de células T CD4⁺ está relacionada com a prevenção da reativação do vírus ao longo da vida, sendo que as células de memória T CD4⁺ VZV-específica apresentam tanto um fenótipo de memória central e efetora e um perfil de citocinas polifuncional, capaz de estimular diversas citocinas como IFN- γ , IL-2 e TNF α (DUNCAN; HAMBLETON, 2015; MALAVIGE et al., 2008; SCHUB et al., 2015). Durante a reativação do VZV, as células T CD4⁺ passam a apresentar um perfil pouco diverso na secreção de citocinas, geralmente secretando apenas IFN- γ , e a expressar marcadores consistentes com anergia (SCHUB et al., 2015).

Levando em consideração a alta mortalidade apresentada nos últimos anos no Brasil, podemos supor que a vacinação contra o vírus da varicela-zoster não está induzindo uma proteção satisfatória a população do país. Portanto, faz-se necessário o esclarecimento dos possíveis fatores que estão contribuindo para essa baixa proteção e alta mortalidade, entre eles, devido ao cenário econômico e político do país, destacam-se o status nutricional e o perfil da microbiota intestinal da população brasileira.

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESE

A desnutrição sofrida na infância altera tanto o perfil da microbiota intestinal quanto suas funções metabólicas e, mesmo tendo recuperação nutricional, tais alterações podem persistir até a vida adulta e terem implicações na funcionalidade do sistema imune de camundongos C57BL/6.

2.2 OBJETIVO GERAL

Determinar o efeito da desnutrição sobre o componente bacteriano da microbiota comensal de camundongos C57BL/6 em termos de composição taxonômica e funcionalidade metabólica.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo específico 1: Avaliar as mudanças de composição do componente bacteriano da microbiota comensal em animais submetidos a desnutrição durante a infância em curto, médio e longo prazo.

Objetivo específico 2: Inferir as funções metabólicas associadas aos perfis de composição da microbiota comensal ao longo do modelo proposto.

Objetivo específico 3: Determinar os efeitos do cotrimoxazol na funcionalidade metabólica da microbiota intestinal de camundongos submetidos a desnutrição na infância.

Objetivo específico 4: Determinar a existência ou não de repercussões funcionais na vida adulta, relacionadas à composição da microbiota ou de parâmetros imunológicos, de animais que sofreram desnutrição na infância.

3 METODOLOGIA

A tese será apresentada no formato de artigo científico, divididos em dois capítulos conforme descrito abaixo:

CAPÍTULO I: Artigo científico intitulado “Prophylactic Treatment of Undernourished Mice with Cotrimoxazole Induces a Different Profile of Dysbiosis with Functional Metabolic Alterations”

Artigo depositado no repositório bioRxiv, em 02 de novembro de 2021. DOI: [10.1101/2021.11.01.466808](https://doi.org/10.1101/2021.11.01.466808)

CAPÍTULO II: Avaliação dos efeitos a curto e a longo prazo na composição da microbiota intestinal e sua repercussão funcional em modelo murino de desnutrição infantil energético-proteica.

4 RESULTADOS

CAPÍTULO I

O primeiro capítulo da tese descreve os esforços em reproduzir o quadro de desnutrição infantil em camundongos C57BL/6 de forma mais próximo do caso observado em humanos, sendo realizado em conjunto com a então mestrande, Gabriela F. Gubert, como citado na introdução. A OMS recomenda no tratamento da desnutrição infantil a administração profilática de cotrimoxazol, além da suplementação alimentar. Entretanto, considerando os efeitos bem conhecidos dos antibióticos em geral, de serem as principais drogas de indução de disbiose, e que pouco se sabe dos efeitos do cotrimoxazol na composição e funcionalidade da microbiota intestinal de crianças desnutridas, o presente capítulo buscou elucidar esses efeitos do uso de cotrimoxazol em camundongos C57BL/6.

Prophylactic Treatment of Undernourished Mice with Cotrimoxazole Induces a Different Profile of Dysbiosis with Functional Metabolic Alterations

Lívia Budziarek Eslabão^{1,2,*}, Gabriela Farias Gubert^{2,*}, Lucas C. Beltrame², Isis M. A. de Mello², Oscar Bruna-Romero^{1,**}, Carlos R. Zárata-Bladés^{2,**}

¹Laboratório de Imunologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário da Trindade, Florianópolis, SC 88034-040, Brazil; liviaeslabao@gmail.com (L.B.E.); oscar.bruna.romero@ufsc.br (O.B.R.)

²Laboratório de Imunorregulação, iREG, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário da Trindade, Florianópolis, SC 88034-040, Brazil; gubert.gabriela@gmail.com (G.F.G.); lucasbeltrame97@gmail.com (L.C.B.); aisismello@gmail.com (I.M.A.d.M.); zarate.blades@ufsc.br (C.R.Z.B.)

* Both authors contributed equally to this work.

** Both authors contributed equally to this work and are corresponding authors: zarate.blades@ufsc.br; oscar.bruna.romero@ufsc.br

Tel.: +55-48-37215210

4.1. Abstract

Childhood malnutrition affects physiology and development. It increases infection rates which may not present clinical signs in severe cases. The World Health Organization recommends prophylactic treatment with Cotrimoxazole (SXT) and nutritional recovery to overcome this issue. This treatment is controversial since evidence of a reduction in morbidity and mortality is not a consensus and could induce the development of antibiotic-resistant bacteria. Moreover, the impact of using this wide-spectrum antibiotic on gut microbiota in a critical period of development and weakness is unknown. To understand how SXT prophylaxis could affect gut microbiota in undernutrition, we induced protein-energy undernutrition in weaning C57BL/6 mice for three weeks and treated animals with SXT for two weeks. Using 16S rRNA gene sequencing, we compared the taxonomic composition and metabolic pathways of control mice, animals submitted to undernutrition (UND), treated with SXT, or undernourished and SXT treated (UND+SXT). The undernutrition protocol was responsible for increasing Bacteroidetes and decreasing the abundance of Firmicutes. We identified that UND mice had a significant increase in predicted pathways related to metabolic syndromes later in life. The prophylactic SXT treatment alone resulted in a significant loss in community richness and beta diversity. Furthermore, we identified the reduction of six families in SXT treated mice, including the butyrate producers Lachnospiraceae and Ruminococcaceae. The double challenge (UND+SXT) resulted in a reduction in Clostridiaceae family and the urea cycle pathway, both related to the fermentation of amino acids, intestinal epithelial permeability, and a healthy gut environment. Our results show that SXT prophylaxis of young mice during an undernourishment period did not re-establish the undernourished microbiota community composition similar to healthy controls but induced a distinct dysbiotic profile with functional metabolic consequences.

Keywords: microbiome 1; undernutrition 2; dysbiosis 3; cotrimoxazole 4; metabolism 5.

4.2. Introduction

Undernutrition still affects approximately 200 million children every year. It is considered one of the leading underlying causes of morbidity and mortality, according to the World Health Organization (WHO) [1]. Undernutrition is defined as the imbalance between the nutrients and/or energy ingestion and the individual's basic needs to sustain the body's homeostasis and its specific functions and, in the case of infants, adequate growth [1]. Additionally, the acute form of malnutrition during childhood affects several organs and functions, from bones to neuronal development, metabolism, immunity, and even the gut microbiota [2–4].

In recent years, the microbiota has emerged as one of the major contributors to maintaining the individual's health status, performing a range of functions from nutrients' metabolism, development and modulation of the immune system, direct protection against infections, and even influencing behavior and cognition [5]. Several factors can greatly modulate the early gut microbiota during neonatal life, including mode of delivery, breastfeeding, use of antibiotics, environmental exposure, and nutritional status. Understanding how nutrition and the gut microbiota of an individual interact with each other is essential to better comprehend the pathogenesis of undernutrition and develop better prevention measures and more effective treatments [6].

Children suffering from malnutrition are more prone to infection, but they may not show signs of clinical infection [7]. As a result, the WHO recommends a course of Cotrimoxazole as a prophylactic treatment, a broad-spectrum antibiotic, in severely malnourished children [8]. The treatment is controversial, being classified by the WHO based on weak evidence [9]. Researchers found no increase in survival in a multicenter, double-blind, randomized controlled trial [10]. There is also the issue of global concern in increasing microbial resistance [11] and the potentiality of disruption of gut microbiota, resulting in broad-spectrum antibiotics-induced dysbiosis [12]. Nonetheless, there is also the opinion that the use of cotrimoxazole during undernutrition treatment could preserve the structure of the microbiome or even be beneficial for it since it would avoid the invasion of pathogens during a period of particular vulnerability [13].

In this study, we reproduced human infant undernutrition and its treatment in mice. The aim was to define the effects of undernutrition, cotrimoxazole, or their association on microbiome composition and functionality. Our results show that each situation results in a different type of dysbiosis and that WHO's malnutrition preconized treatment might not lead to the re-establishment of a healthy gut microbiome.

4.3. Materials and Methods

Animal and study design

C57BL/6 mice with the age of 3-4 weeks were randomly housed in groups of three animals per microisolator cage (Alesco, Campinas, Brazil) on sterilized wood chip bedding under controlled temperature (21 ± 1 °C) and humidity ($50 \pm 20\%$) with a 12 h light/dark cycle. All animals were acclimated for four days to recover from transport stress before beginning the experimental protocol. The mice had ad libitum access to sterilized distilled water and an irradiated diet during the acclimation period.

After acclimation, mice weighing 10.9 ± 1.52 g (mean \pm SD) were randomly grouped into ad libitum control group or undernourished group. The control group and the undernourished group were divided into two sub-groups to study the effect of antibiotic therapy on food intake and gut microbiota: no additional treatment and cotrimoxazole-treatment. Thus, the experiment was carried out in four groups: control group (CON) (n = 6), cotrimoxazole-treated group (SXT) (n = 6), undernourished group (UND) (n = 6), and undernourished and cotrimoxazole-treated group (UND+SXT) (n = 6). The undernourishment model protocol was adapted from Mittal and Woodward [14]. Undernourished groups (UND and UND+SXT) were fed with diets containing only 60% of the total food consumed by CON and SXT groups, consisting of 1.4 g of food per animal consumed daily by the undernourished groups. Feeding was performed in the afternoon to respect the mice's circadian rhythms. The food restriction protocol was sustained for three weeks.

The SXT protocol was carried out for two weeks before the end of the food restriction period. Mice of the SXT and UND+SXT groups were treated daily with SXT (a

combination of 25 mg/kg of sulfamethoxazole + 5 mg/kg of trimethoprim) for two weeks as recommended by the WHO [8] for cases of severe malnutrition without apparent infection. SXT was purchased in a veterinary pharmacy with banana flavoring for greater palatability to the animals. The drug application volume was adjusted to 50 μ L, containing 10 μ L of cotrimoxazole and 40 μ L of ultrapure water (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Finally, the drug was administered orally through a cannula and syringe system.

All procedures were performed following the Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals from the Brazilian College of Animal Experimentation and were approved by the Institution's Ethics Committee under protocol number 5560250219. All efforts were made to minimize animal suffering and reduce the number of animals used in the experiments.

Fecal sampling and DNA extraction

Fecal samples were collected individually from the mice at day 0 (before the food restriction protocol) and at day 21 (end of the food restriction protocol). Samples were collected from each mouse independently by performing a tail-lift and aseptically collecting the fecal content directly from the anus into sterile tubes. The fecal samples were immediately transferred to liquid nitrogen and subsequently stored at -80 °C until processing.

According to the manufacturer's recommendation, DNA extraction was performed on weighted fecal samples using a FastDNA™ SPIN Kit (MP Biomedicals, Santa Ana, USA).

16S rRNA gene sequence and analysis

The DNA extracts were quantified with Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA) and amplified using primers 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') and 806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3') for the V3-V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene associated with a barcode sequence, as described by Yu et al. [15]. Polymerase chain reactions were performed with 15 μ L Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, USA), 0.2 μ M

of forwarding primer, 0.2 μ M of reverse primer, and 10 ng of template DNA. Amplification conditions consisted in an initial denaturation at 98 °C for 1 min, followed by 30 cycles of denaturation at 98 °C for 10 s, annealing at 50 °C for 10 s, and extension 72 °C for 60 s, with a final extension of 72 °C for 5 min. Amplification was confirmed through electrophoresis in agarose gel, resulting in amplicons with approximately 400-450 bp. Amplicons were purified with Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and prepared using TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, USA) following the manufacturer's instruction. Finally, the library was sequenced on an Illumina HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, USA), resulting in 250 bp paired-end reads. 16S rRNA gene sequence was performed by GenOne Biotech (Rio de Janeiro, Brazil).

According to sequence size and Phred score, paired-end 16S rRNA gene sequences with low quality were filtered with Trimmomatic v0.36 [16]. Nucleotides with a Phred score under 33 at the beginning and end of each sequence and sequences shorter than 200 nucleotides were considered low quality and removed. Barcode and primer sequence were also removed. Paired-end sequences were merged using DADA2 [17], available with the Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2 (QIIME 2) software [18]. Chimera removal, singletons filtering, amplicon sequence variant generation (ASV), and rare ASV removal were also assessed using DADA2 pipeline. Taxonomy was assigned according to VSEARCH using the Greengenes v13.8 database [19][20]. PICRUSt2 was used to predict metagenomic functions based on the normalized ASV tables [21].

Statistical analysis of 16S rRNA sequencing data

All statistical analyses for 16S rRNA sequence data were performed in R v4.1.0 [22]. Alpha diversity measure of bacterial richness (observed species and Chao1) and diversity (Shannon and Simpson) were analyzed using the phyloseq R package [23]. Student's t-test or ANOVA followed by Tukey post hoc test was applied for parametric data, and Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis followed by Dunn's test of multiple comparisons for non-parametric data to test the statistical significance of alpha diversity. Bray-Curtis distance metrics were used to access beta diversity through the phyloseq R package [23] and vegan R package [24]. Multivariate permutation analysis of variance (ADONIS) was conducted with 10000 permutations [25] to access beta diversity statistical

significance. Principal Coordinates Analysis (PCoA) of Bray-Curtis distance was performed using the vegan R package [24]. Differences in bacterial taxa abundance between experimental groups were evaluated using the Kruskal-Wallis test and LEfSe analysis (linear discriminant analysis-LDA coupled with effect size measurements) [26]. The LEfSe analysis was performed under the following conditions: the α value for the factorial Kruskal–Wallis test and pairwise Wilcoxon test among classes was < 0.05 , and the threshold on the logarithmic LDA score for discriminative features was > 2.0 . Prediction metagenomic functions were analyzed through LEfSe analysis, and Kruskal-Wallis test with Benjamini–Hochberg False Discovery Rate (FDR) adjust-ed p-value. Data with $p < 0.05$ were considered to be significant.

4.4. Results

4.4.1. Changes in body weight and daily weight gain in C57BL/6 mice during undernourishment induction

C57BL/6 mice aged 3-4 weeks were randomly assigned to CON or UND groups (Day -3). The mice from the CON group were offered food ad libitum. The undernourishment protocol consisted of a reduction of 40% of the daily food consumption for three weeks (from experimental day 0 to day 21) [14] (Figure 1A).

The undernourishment protocol resulted in a significant body weight loss compared to same-age healthy C57BL/6 mice (Figure 1B). The lowest body weight was observed at the end of the food restriction protocol with undernourished mice weighing 10.99 g (± 1.18) and control mice weighing 19.62 g (± 1.28) ($p < 0.0001$). As expected, the daily weight gain in undernourished mice (0.088 g \pm 0.080) was significantly lower compared to the daily weight gain in control mice (0.449 g \pm 0.078) ($p < 0.0001$) during the establishment of the food restriction protocol (Figure 1C). At experimental day 21, the end of food restriction, undernourished mice had a significantly lower body mass index (BMI) (0.088 kg/m² \pm 0.009) compared to control mice (0.129 kg/m² \pm 0.008) ($p < 0.0001$).

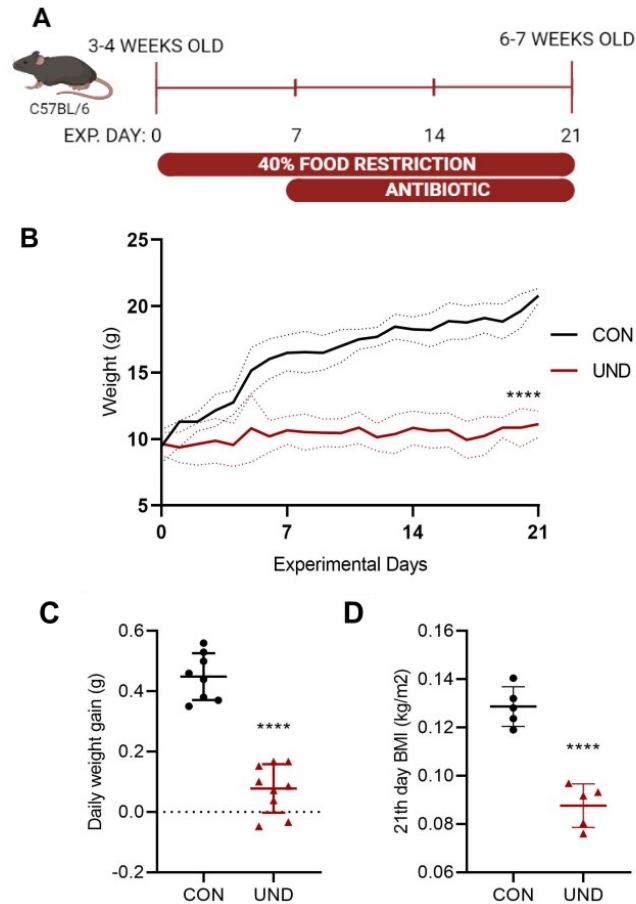


Figure 1. Changes in body weight during undernourishment induction through food restriction. (a) Experimental design, C57BL/6 mice with 3-4 weeks old were submitted to 40% food restriction for 21 experimental days (exp. day 21). (b) Body weight (g) changes in male C57BL/6 mice during the experimental protocol. (c) Daily weight gain (g) for the 3 weeks food restriction period. (d) BMI at the 21st experimental day. $n = 5$ animals per group. Experiments were repeated at least three times. Data for one typical experiment are shown. Statistical significances were assessed by Mann-Whitney U test. Data expressed as mean \pm SD. **** $p < 0.0001$.

4.4.2. Effects of undernourishment on the microbiota composition and function

The gut microbiota was analyzed through 16S rRNA gene sequencing of fecal samples to study the effects of undernourishment on the microbiota composition and function. After data processing and quality check, there were 2,879,810 reads with an

average of 115,192 reads per sample. Sequences were clustered into ASVs, resulting in 11,126 ASVs with an average of 445 ASVs per sample. We analyzed the fecal microbiota composition between CON and UND mice at the end of the food restriction period. Regarding the microbiota composition, 17 main phyla were found in which Bacteroidetes, Firmicutes, and Proteobacteria were the most abundant (Figure 2A). Alpha diversity analysis showed no difference in community richness (Observed ASV and Chao1) and diversity indices (Shannon and Simpson) between CON and UND mice (Supplemental figure S1). PCoA was performed using Bray-Curtis distances to illustrate the intra-group microbial community's differences after the undernourishment protocol, revealing distinct findings (Figure 2B). UND microbiota was significantly different in community composition when compared to CON microbiota (ADONIS with 10000 permutations, $p = 0.004$)

LEfSe analysis was used to compare the gut microbiota taxa that were significantly different between the CON and UND groups (Figure 2C). When comparing taxa at the phylum level, UND mice showed an increase in Bacteroidetes and a decrease in Firmicutes and Deferribacteres. Additionally, UND mice presented an increase in the Coprococcus genus (0.0056 ± 0.002 vs. 0.002 ± 0.0003) and a decrease in Mucispirillum (0.0009 ± 0.0008 vs. 0.007 ± 0.012), Helicobacter (0.0062 ± 0.002 vs. 0.0168 ± 0.011), Ruminococcus, Oscillospira (0.0299 ± 0.005 vs. 0.0440 ± 0.011), and Sphingomonas (0.0001 ± 0.0001 vs. 0.0005 ± 0.0001) genera. Figure 2D shows the differences in the abundance of taxonomic clades of the LDA score > 2.0 between CON and UND mice.

Metabolic pathways were accessed using PICRUS2 to determine whether the observed taxonomic differences between groups played a role in function. LEfSe analysis compared metabolic changes in the gut microbiota in each group (Figures 2E). All displayed pathways presented an LDA score > 2.0 . The UND group changes were mainly related to cellular growth. Pathways related to the biosynthesis of sugar nucleotides [O-antigen building blocks biosynthesis (0.066 ± 0.004 vs. 0.073 ± 0.005), UDP-N-acetyl-D-glucosamine biosynthesis I (0.052 ± 0.006 vs. 0.062 ± 0.007)], amino acids [L-lysine biosynthesis I (0.074 ± 0.006 vs. 0.083 ± 0.006), L-arginine biosynthesis II (0.081 ± 0.009 vs. 0.092 ± 0.006)], cell membrane lipids [phosphatidylglycerol biosynthesis I ($0.0921 \pm$

0.003 vs. 0.099 ± 0.006), phosphatidylglycerol biosynthesis II (0.0921 ± 0.003 vs. 0.099 ± 0.006) were less present compared to the CON group. Moreover, with the compromising of growth-related metabolic pathways, UND presented increases in cell component degradation pathways, such as carbohydrates [pentose phosphate pathway (0.073 ± 0.008 vs. 0.062 ± 0.005)], polysaccharides [mannan degradation (0.047 ± 0.007 vs. 0.038 ± 0.005)], purine nucleotides [urate biosynthesis/inosine 5'-phosphate degradation (0.112 ± 0.005 vs. 0.101 ± 0.008)], and cellular wall [chitin derivatives degradation (0.00011 ± 0.00022 vs. 0 ± 0)]. There was also an increase in vitamin biosynthesis-related pathways of preQ0 biosynthesis (0.067 ± 0.007 vs. 0.05 ± 0.006), 6-hydroxymethyl-dihydropterin diphosphate biosynthesis III (0.097 ± 0.005 vs. 0.088 ± 0.007), and 6-hydroxymethyl-dihydropterin diphosphate biosynthesis I (0.096 ± 0.005 vs. 0.087 ± 0.007).

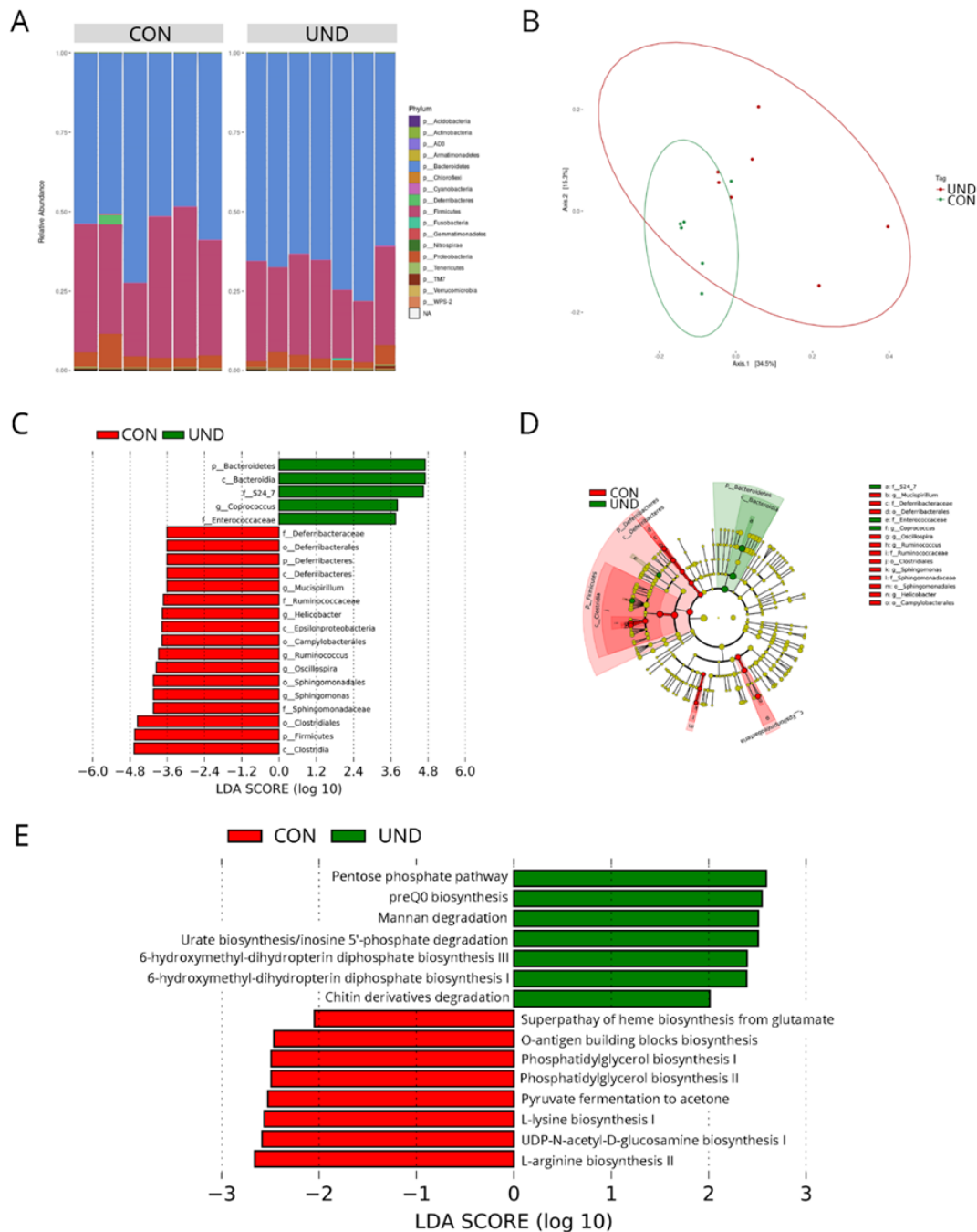


Figure 2. The gut microbiota composition and inferred functional content of gut microbiota between of control (CON) and undernourished (UND) C57BL/6 mice. (a) Relative abundance at the phylum level for groups of CON (n = 6) and UND (n = 7) C57BL/6 mice; (b) Principal coordinate analysis (PCoA) of Bray-Curtis distances among groups of CON (n = 6) and UND (n = 7) C57BL/6 mice. Each point corresponds to a community from a

single mouse. Colors indicate group identity. Ellipses show the 95% confidence intervals. Intra-group differences were evaluated using ADONIS test ($p < 0.05$); (c) LEfSe linear discriminant analysis (LDA) scores showing differentially abundant taxonomic clades with an LDA score > 2.0 in the gut microbiota of CON ($n = 6$) and UND ($n = 7$) C57BL/6 mice; (d) Cladogram of LEfSe LDA scores for significantly different taxonomic clades for the gut microbiota of CON ($n = 6$) and UND ($n = 7$) C57BL/6 mice; (e) LEfSe LDA scores showing significant pathway differences between CON ($n = 6$) and UND ($n = 7$) C57BL/6 mice. Significant differences between groups were tested with Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$).

4.4.3. Effects of Cotrimoxazole (SXT) on the gut microbiome

We analyzed the fecal microbiota composition between the mice from the CON and SXT groups at the end of the antibiotic treatment to study the effect of the SXT treatment on the microbiota composition and function. Regarding the microbiota composition, the same 17 main phyla found in UND were present in SXT (Figure 3A). Alpha diversity analysis showed a significant difference in community richness (Observed, $p = 0.0397$; and Chao1, $p = 0.04061$) between CON and SXT mice (Figure 3B). In contrast, there was no difference in diversity indices (Shannon and Simpson) between both groups (Figure 3B). PCoA was performed using Bray-Curtis distances to illustrate microbial community changes after the antibiotic treatment (Figure 3C). SXT microbiota was significantly different regarding community composition following the antibiotic treatment compared to the CON microbiota (ADONIS, $p = 0.02$).

LEfSe analysis showed the presence of 14 taxa in the CON microbiome compared to the SXT microbiome (Figure 3D). We identified no significant taxa in the SXT microbiome. Differences did not appear at a phylum level, but six families were impacted by the antibiotic treatment, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Streptococcaceae, Sphingomonadaceae, Dehalobacteriaceae, and Entereobacteriaceae (Figure 3D). Figure 3E shows differences in the abundance of taxonomic clades of LDA score > 2.0 between CON and SXT mice.

Figure 3F showed the LEfSe analysis comparing metabolic changes in the gut microbiota of CON and SXT mice. SXT increased pathways related to nucleotide synthesis [5-aminoimidazole ribonucleotide biosynthesis I (0.113 ± 0.003 vs. 0.1104 ± 0.003); adenosine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis II (0.09398 ± 0.002 vs. 0.09379 ± 0.002); guanosine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis II (0.09398 ± 0.002 vs. 0.09379 ± 0.002); superpathway of GDP-mannose-derived O-antigen building blocks biosynthesis (0.072 ± 0.003 vs. 0.068 ± 0.003); CMP-3-deoxy-D-manno-octulosonate biosynthesis I (0.0627 ± 0.003 vs. 0.0553 ± 0.005)], vitamin synthesis [thiazole biosynthesis I (0.0501 ± 0.003 vs. 0.0457 ± 0.004); superpathway of thiamin diphosphate biosynthesis I (0.0803 ± 0.003 vs. 0.0743 ± 0.004)], lipid metabolism [fatty acid elongation (0.098 ± 0.001 vs. 0.095 ± 0.002)], and alcohols [polyisoprenoid biosynthesis (0.083 ± 0.001 vs. 0.08 ± 0.001)]. In contrast, SXT decreased carbohydrate and amine degradation [sucrose degradation III (0.055 ± 0.006 vs. 0.0724 ± 0.012); superpathway of N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine and N-acetylneuraminate degradation (0.0403 ± 0.003 vs. 0.0536 ± 0.008)], fermentation of pyruvate or short-chain fatty acids [acetylene degradation (0.0244 ± 0.004 vs. 0.031 ± 0.004)], and formation of cell wall [teichoic acid biosynthesis (0.006 ± 0.001 vs. 0.009 ± 0.001)] compared to CON mice.

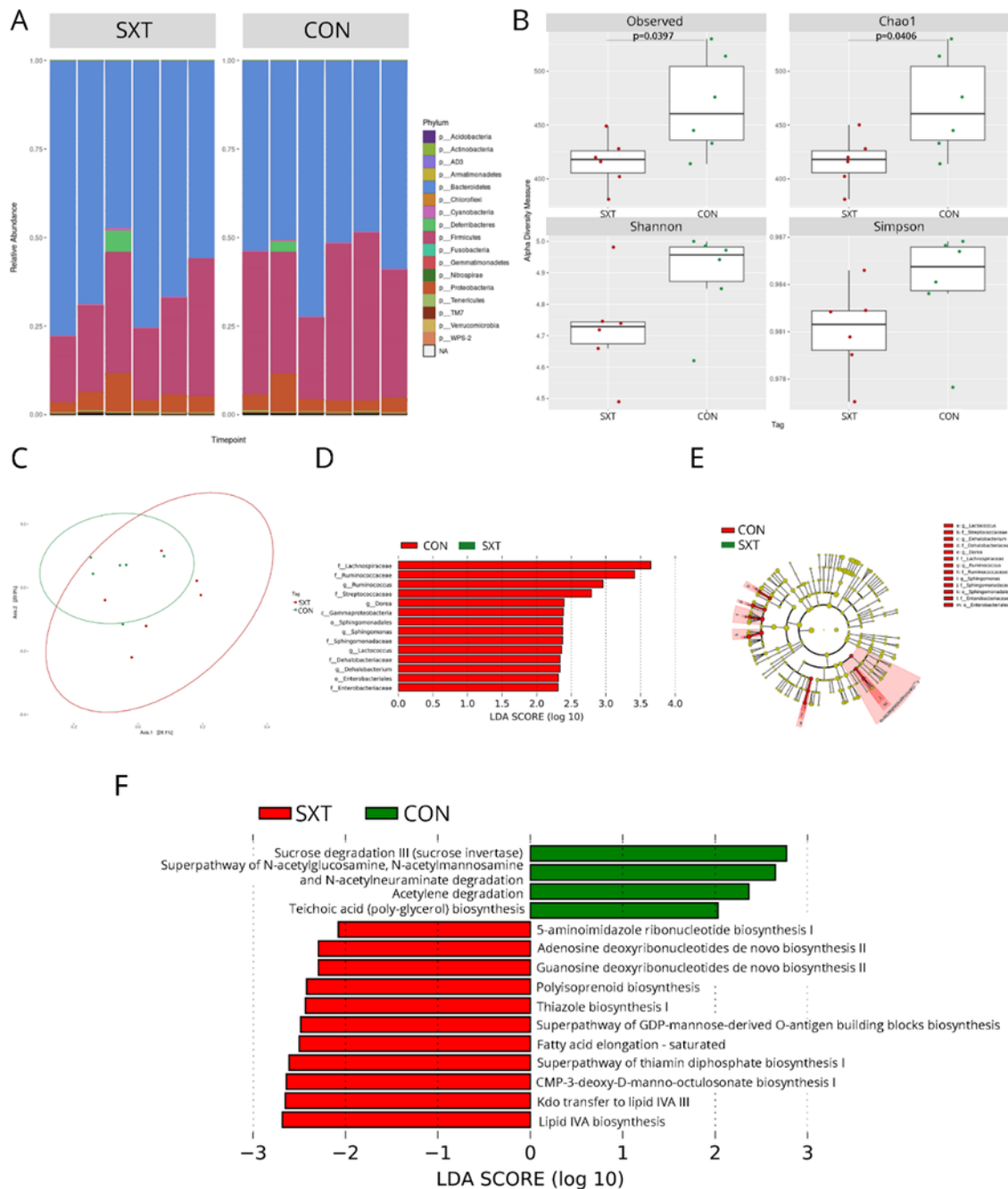


Figure 3. The gut microbiota composition and inferred functional content of gut microbiota between of control (CON) and cotrimoxazole (SXT) C57BL/6 mice. (a) Relative abundance at the phylum level for groups of CON (n = 6) and SXT (n = 6) C57BL/6 mice; (b) Richness (Observed and Chao1) and diversity (Shannon and Simpson) indexes for

groups of CON (n = 6) and SXT (n = 6) C57BL/6 mice; (c) PCoA of Bray Curtis distances among groups of CON (n = 6) and SXT (n = 6) C57BL/6 mice. Each point corresponds to a community from a single mouse. Colors indicate group identity. Ellipses show the 95% confidence intervals. Intra-group differences were evaluated using ADONIS test ($p < 0.05$); (d) LEfSe LDA scores showing differentially abundant taxonomic clades with an LDA score > 2.0 in the gut microbiota of CON (n = 6) and SXT (n = 6) C57BL/6 mice; (e) Cladogram of LEfSe LDA scores for significantly different taxonomic clades for the gut microbiota of CON (n = 6) and SXT (n = 6) C57BL/6 mice; (f) LEfSe LDA scores showing significant pathway differences between CON (n = 6) and SXT (n = 6) C57BL/6 mice of PICRUST predicted the relative MetaCyc pathways abundances. Significant differences between groups were tested with Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$).

4.4.4. Impact of the combination of undernourishment and the use of cotrimoxazole (UND+SXT) on microbiota composition and function

The analysis of the microbiota composition showed the same 17 main phyla in CON and UND-SXT (Figure 4A). The undernutrition treated with a prophylactic course of antibiotics did not alter alpha diversity (data not showed). However, UND+SXT microbiota is significantly different in community composition compared to CON microbiota (ADONIS, $p = 0.0003$) (Figure 4B).

LEfSe analysis showed a significant reduction in UND+SXT microbiome compared to CON (Figure 4C). The double treatment significantly impacted the Clostridiaceae, Enterobacteriaceae, and Porphyromonadaceae families, while Rikenellaceae increased. Additionally, four genera are significantly lower in UND+SXT compared to CON, Parabacteroidetes (0.0407 ± 0.009 vs. 0.0584 ± 0.0119), Candidatus arthromitus (0.00033 ± 0.00019 vs. 0.00119 ± 0.00065), Sutterella (0.00028 ± 0.00009 vs. 0.00083 ± 0.0004), and Adlercreutzia (0.000116 ± 0.00007 vs. 0.00022 ± 0.00006). Figure 4D shows the differences in the abundance of taxonomic clades of LDA score > 2.0 between CON and UND+SXT mice.

The LEfSe analysis comparing metabolic changes in the gut microbiota exposed changes in the double treatment, is presented in Figure 4E. The microbiota of UND+SXT

mice presented a reduction in pathways related to enzymes cofactor synthesis [adenosylcobalamin salvage from cobinamide I (0.336 ± 0.037 vs. 0.364 ± 0.041)], sulfur and nitrogen compounds metabolism [superpathway of sulfur oxidation (0.052 ± 0.005 vs. 0.068 ± 0.014); and urea cycle (0.217 ± 0.02 vs. 0.253 ± 0.018)] compared to the CON group, a unique pathway increase in amino acids synthesis [L-methionine biosynthesis III (0.392 ± 0.035 vs. 0.313 ± 0.034)].

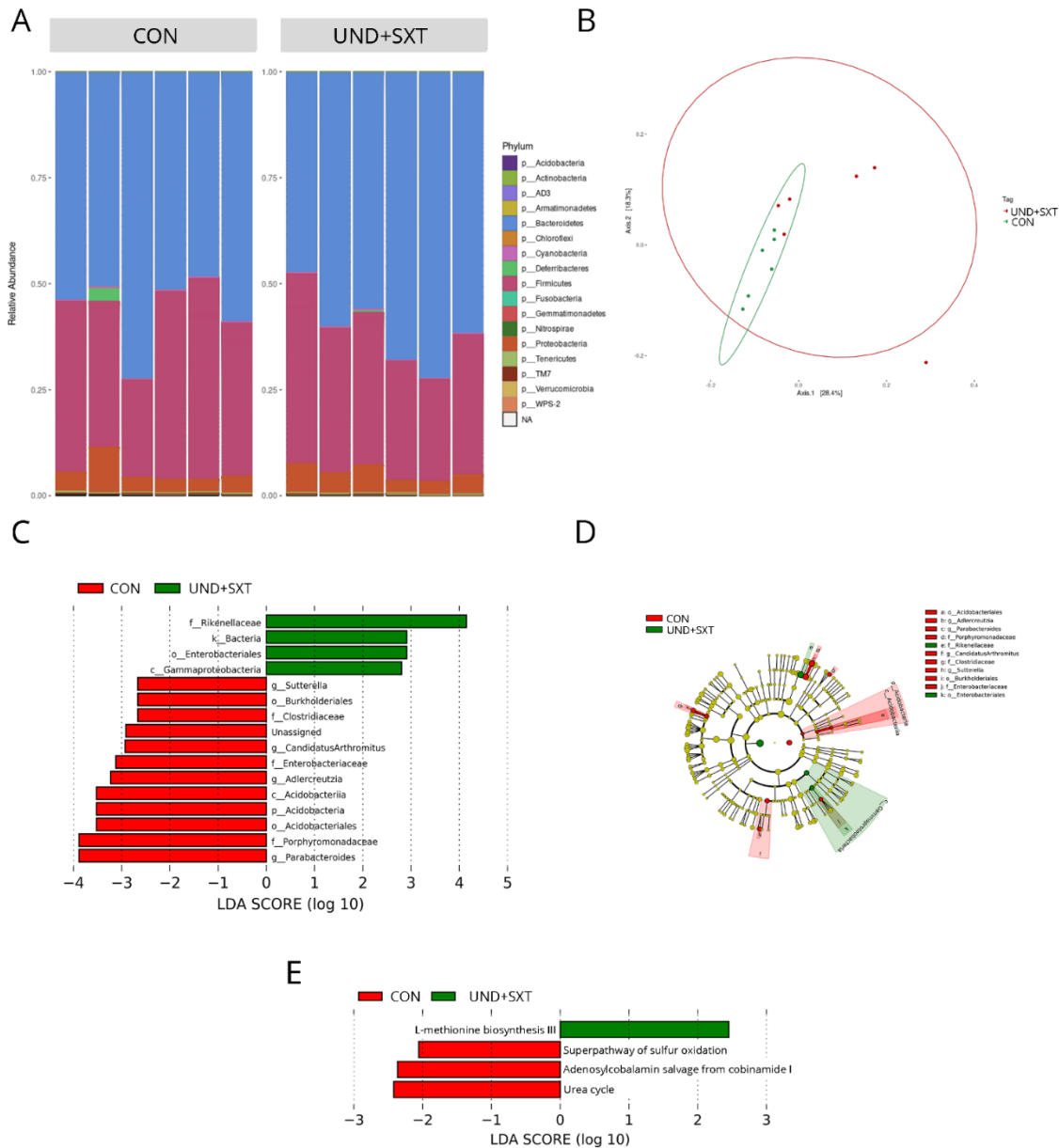


Figure 4. The gut microbiota composition and inferred functional content of gut microbiota between of control (CON) and cotrimoxazole-treated undernourished (UND-SXT) C57BL/6 mice. (a) Relative abundance at the phylum level for groups of CON (n = 6) and UND+SXT (n = 6) C57BL/6 mice; (b) PCoA of Bray Curtis distances among groups of CON (n = 6) and UND+SXT (n = 6) C57BL/6 mice. Each point corresponds to a community from a single mouse. Colors indicate group identity. Ellipses show the 95% confidence intervals. Intra-group differences were evaluated using ADONIS test ($p < 0.05$); (c) LefSe LDA scores showing differentially abundant taxonomic clades with an LDA score > 2.0 in the gut microbiota of CON (n = 6) and UND+SXT (n = 6) C57BL/6 mice; (d) Cladogram of LefSe LDA scores for significantly different taxonomic clades for the gut microbiota of CON (n = 6) and UND+SXT (n = 6) C57BL/6 mice; (e) LefSe LDA scores showing significant pathway differences between CON (n = 6) and UND+SXT (n = 6) C57BL/6 mice of PICRUSt predicted the relative MetaCyc pathways abundances. Significant differences between groups were tested with Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$).

4.4.5. The use of cotrimoxazole during undernourishment in infant mice does not revert undernutrition effects on microbiota, but results in a distinct profile of dysbiosis

The microbiota composition shows the same 17 main phyla in all other treatment groups (Figure 5A). The undernutrition treated with a prophylactic course of cotrimoxazole did not alter alpha diversity compared to UND and CON (Supplemental figure S1). However, CON, UND, and UND+SXT microbiota profiles are significantly different in community composition compared to each other (ADONIS, $p = 0.00029$) (Figure 5B).

LefSe analysis showed that both CON and UND had significant differences in the microbiome composition when the three groups were considered (Figure 5C). However, UND+SXT microbiota showed no differences in specific taxa compared to both other groups. The taxa identified as differentially present in the other two groups by LefSe analysis indicate that these taxa are less abundant in UND+SXT mice. Although Bacteroidetes phylum was significantly increased in UND mice compared to CON and UND+SXT mice, we observed a significant increase in members of Firmicutes (Clostridium and Coprococcus) and Actinobacteria (Adlercreutzia) phyla. Besides that,

CON mice presented a significant increase in Firmicutes phylum. We also observed an increase in *Helicobacter*, *Sutterella*, and *Sphingomonas* genera, members of the Proteobacteria phylum. Figure 5D shows differences in the abundance of taxonomic clades of LDA score > 2.0 between CON, UND, and UND+SXT mice.

The LEfSe analysis comparing metabolic changes in the gut microbiota of control mice, undernourished mice, and double treatment mice are presented in Figure 5E. The microbiota of UND+SXT mice presented a reduction in pathways related to energy production from organic substrates [methylaspartate cycle (0.00001 ± 0.00001 vs. 0.00006 ± 0.00006 vs. 0.00009 ± 0.00005 for UND+SXT, UND, and CON, respectively)] and inorganic nutrient metabolism [superpathway of sulfur oxidation (0.02 ± 0.002 vs. 0.034 ± 0.012 vs. 0.027 ± 0.0064 for UND+SXT, UND, and CON, respectively)] when compared to CON and UND mice. UND+SXT microbiota also presented an increase in pathways related to sugar nucleotide biosynthesis [dTDP-N-acetylthomosamine biosynthesis (0.071 ± 0.008 vs. 0.052 ± 0.011 vs. 0.065 ± 0.017 for UND+SXT, UND, and CON, respectively)] and short-chain fatty acids fermentation [pyruvate fermentation to acetate and lactate II (0.332 ± 0.005 vs. 0.329 ± 0.012 vs. 0.325 ± 0.009 for UND+SXT, UND, and CON, respectively)]. Also, UND microbiota presented an increase in the generation of precursor metabolites and energy pathway [pentose phosphate pathway (0.155 ± 0.024 vs. 0.187 ± 0.027 vs. 0.152 ± 0.018 for UND+SXT, UND, and CON, respectively)]. Furthermore, CON microbiota presented an increase in pathways related to amino acid biosynthesis [L-lysine biosynthesis I (0.196 ± 0.009 vs. 0.189 ± 0.011 vs. 0.202 ± 0.012 for UND+SXT, UND, and CON, respectively) and L-arginine biosynthesis II (0.225 ± 0.014 vs. 0.207 ± 0.017 vs. 0.227 ± 0.013 for UND+SXT, UND, and CON, respectively)].

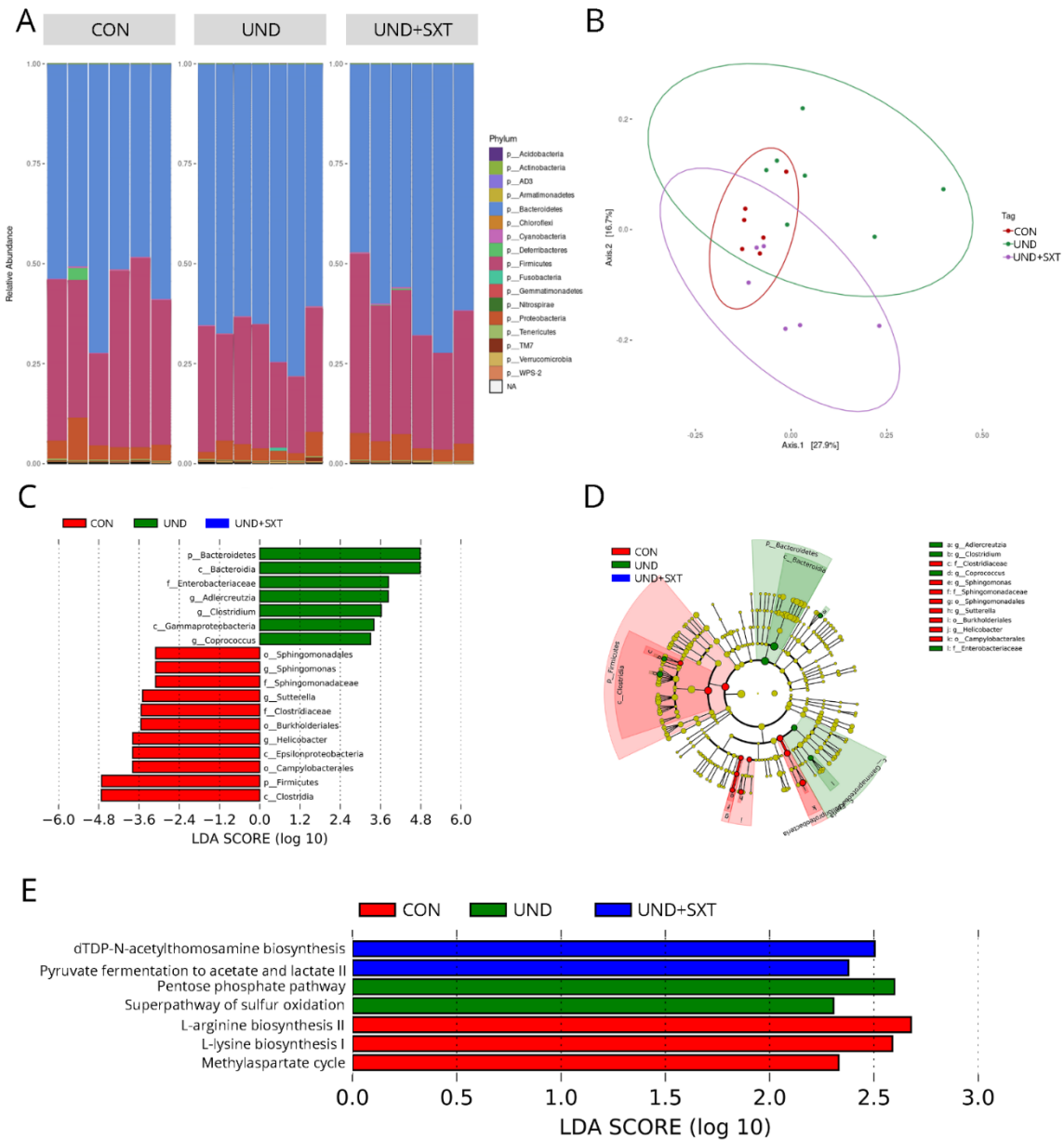


Figure 5. The gut microbiota composition and inferred functional content of gut microbiota between of control (CON), undernourished (UND), and cotrimoxazole-treated undernourished (UND-SXT) C57BL/6 mice. (a) Relative abundance at the phylum level for groups of CON (n = 6), UND (n = 7), and UND+SXT (n = 6) C57BL/6 mice; (b) PCoA of Bray Curtis distances among groups of CON (n = 6), UND (n = 7), and SXT (n = 6) C57BL/6 mice. Each point corresponds to a community from a single mouse. Colors indicate group identity. Ellipses show the 95% confidence intervals. Intra-group differences were evaluated using ADONIS test ($p < 0.05$); (c) LefSe LDA scores showing

differentially abundant taxonomic clades with an LDA score > 2.0 in the gut microbiota of CON (n = 6), UND (n = 7), and UND+SXT (n = 6) C57BL/6 mice; (d) Cladogram of LEfSe LDA scores for significantly different taxonomic clades for the gut microbiota of CON (n = 6), UND (n = 7), and UND+SXT (n = 6) C57BL/6 mice; (e) LEfSe LDA scores showing significant pathway differences between CON (n = 6), UND (n = 7), and UND+SXT (n = 6) C57BL/6 mice of PICRUST predicted the relative MetaCyc pathways abundances. Significant differences between groups were tested with Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$).

4.5. Discussion

In the present study, we characterized the gut microbiota profile of undernourished (UND), cotrimoxazole-treated (SXT), and undernourished cotrimoxazole-treated (UND+SXT) C57BL/6 mice after three weeks of protein-energy undernourishment and compared them to healthy control mice (CON). Our experimental protocol was carried out in animals just after weaning, intended to resemble undernutrition in children. Moreover, the main objective of our study was to establish the effects of SXT on the microbiota of undernourished mice, a wide-spectrum antibiotic therapy recommended by WHO and routinely used in undernourished children.

First, our results showed that C57BL/6 mice who underwent three weeks of protein-energy undernourishment presented no significant differences in fecal microbiota richness compared to healthy controls. However, they did present a significant change in beta diversity analysis. These are following the results of [27]. We observed major phylum-level alterations in UND mice compared to CON mice, including a depletion in obligate anaerobic bacteria, such as Firmicutes (Ruminococcaceae and Oscillospiraceae) and Deferribacteres (Deferribacteraceae). These findings support clinical studies where the infants' malnutrition was associated with reducing anaerobic bacteria [28–30]. Other studies have associated the presence of Oscillospiraceae with leanness and a lower body mass index (BMI) in children, adults, and germ-free mice colonized with human fecal samples [31,32]. However, Oscillospiraceae decreases in abundance during the onset of inflammatory diseases, such as inflammatory bowel disease (IBD) [33], and the undernourished state in early life has been associated with increased inflammation markers

[34,35]. The microbiota immaturity caused by poor nutrition might increase enteropathogenic species and the gut barrier dysfunction, factors associated with inflammation in early life [36]. Thus, considering these studies and our findings concerning the decrease in Oscillospiraceae in UND mice, we speculate that our undernourished model might also compromise the gut barrier, leading to an inflammatory state and the further alteration in the gut microbiota. In addition, we observed that Bacteroidetes, mostly from the Muribaculaceae family, were significantly increased in UND mice compared to healthy controls. These findings contradict other studies in which a decrease in Bacteroidetes was observed in undernourished children and undernourished neonatal mice [30,37], although in the last case, the authors used outbred CD1 mice and not C57BL/6 isogenic mice, as was used here. Previous studies demonstrated that Muribaculaceae was correlated with the inner mucus layer formation and function in the colon and with the production of propionate, a short-chain fatty acid (SCFA) [38,39]. Thus, additional histological analysis is needed to understand the effects of malnutrition on the intestinal tissue of this model.

We also observed differences in metabolic pathways between CON and UND mice. In UND mice, the pathways involved in the biosynthesis and/or the degradation of carbohydrates, polysaccharides, purine nucleotides, and cellular wall were increased. The double burden of malnutrition (DBM) is characterized by the coexistence of undernutrition in early life and overweight, obesity, and non-communicable diseases related to diet in later life [40]. Several studies have associated undernutrition at a young age with diseases later in life, such as diabetes, hypertension, and metabolic syndrome [40,41]. Furthermore, metabolic syndromes are also correlated with hyperuricemia, a pathological condition characterized by the overproduction and/or decreased excretion of uric acid [42]. Although not yet fully elucidated, evidence indicates that gut bacteria directly affect host urate degradation [43]. Our study identifies an increase in the purine nucleotides degradation pathway, which leads to the urate biosynthesis, suggesting a possible onset of hyperuricemia, and probably leading to metabolic dysfunctions later in life. We also observed that UND mice increased the pentose phosphate pathway, a metabolic pathway involved in glucose oxidation. The pentose phosphate pathway is increased in the gut microbiome after depleting body glycogen stores during periods of insufficient carbohydrate consumption [44]. We may speculate that the pentose phosphate pathway was

avored in our UND mice in response to carbohydrate consumption limitation during the food restriction protocol. Furthermore, UND mice might increase the metabolic pathways leading to folate (vitamin B9) biosynthesis. Folate is essential for the maintenance of Treg cells [45], and deficiencies in vitamin B9 lead to the development of intestinal inflammation [46]. It may be the case that the higher abundance of folate pathways in UND mice microbiota compared to CON mice regulates the inflammatory environment in consequence of malnutrition. The lysine biosynthesis reduction could also be related to the inflammatory environment, as its levels decrease in metabolic syndrome patients and correlate negatively with cardiometabolic features and inflammatory biomarkers [47]. Our findings further suggest that malnutrition during infancy in mice might lead to metabolic alterations later in life.

Despite the efforts to achieve better clinical outcomes, 10 to 15% of undernourished children cannot recover even after controlled treatment [48]. Several studies have reported a higher prevalence of clinically significant infections among children who have been hospitalized for severe malnutrition [49,50]. However, diagnosing severe infection is difficult during undernutrition since affected children might not present clinical signs of infection [49], hence the WHO recommendation for the SXT prophylactic treatment along with the ready-to-use therapeutic food (RUTF). Adding to the debate regarding WHO guidelines, the SXT mice had a significant loss in community richness (Observed and Chao1) but no changes in diversity indices (Shannon and Simpson). In the case of HIV-exposed infants SXT therapy did not change the microbiome taxonomic composition or functional metabolic pathways [51, 52]. Other studies with HIV and hematological patients found no significant difference in α -diversity in the gut microbiome after SXT prophylaxis [52,53]. Nonetheless, according to beta diversity analysis, SXT treatment resulted in a microbiota community profile distinct from healthy control animals, with six bacterial families depleted and three genera reduced. Reduction in the Lachnospiraceae family has a highly profound short-term effect on the human gut microbiome after administration of commonly used antibiotics, such as β -lactams and fluoroquinolones [54]. Lachnospiraceae and Ruminococcaceae family members are important butyrate producers, which is an important gut mucosal immune regulator derived from the microbiota and one of the best functional markers for a healthy mature gut microbiota [55]. Regarding the decrease in

Dehalobacterium, models for autism spectrum disorder also found this reduction, and associated it with altered behavior, an increase of TNF- α expression, the onset of a colon proinflammatory state in female mice, and increased gut permeability in male mice [56]. As mentioned, we also observed a reduction in Sphingomonas, a major environmental microorganism that is not found in high abundance in the gut microbiota [57]. However, its presence has been shown to stimulate iNKT cells [57,58]. Additionally, the decrease in the Enterobacteriaceae family in SXT treated mice seems positive since several pathogenic species responsible for major economic loss and health-related impacts are part of this family [59]. Furthermore, a high abundance of Enterobacteriaceae family members was correlated with neutrophilia and lower oral vaccine responses in a Bangladeshi infant cohort with a 4-8% prevalence of moderate wasting malnutrition and a 10-12% prevalence of moderate stunting [60]. The use of antibiotic therapy usually results in the depletion of butyrate-producing bacteria, which reduces the expression of the receptor mediating butyrate oxidation [61,62]. This alteration is followed by lower epithelial oxygen use and increased gut oxygen availability, which promotes the expansion of aerobic bacteria, including Enterobacteriaceae members [62]. Even though we detected a reduction in taxa related to butyrate production, we did not detect an increase in Enterobacteriaceae colonization after SXT prophylaxis. In a remarkable study, Kau et al. [6] demonstrated a link between weight loss associated phenotype, disruption of the gut barrier function, and the development of an abnormal mucosal immunity to the presence of Enterobacteriaceae family members and related enteropathogenic microorganisms in gnotobiotic mice after colonization with fecal microbiota from Malawian twins discordant for kwashiorkor. Together, our results suggest that SXT prophylaxis favors a gut microenvironment with fewer taxa responsible for immune system stimulation in addition to impairing the colonization of opportunistic pathogens.

We also observed that the purine nucleotide biosynthesis pathway increased in SXT mice. Commensal bacteria are responsible for the constitutive development of intestinal Th17 cell differentiation, partly due to purinergic receptor signaling [63]. On the other hand, immunosuppressive and anti-inflammatory effects can also be mediated by purinergic signaling. The purine nucleotide biosynthesis pathway 5-aminoimidazole ribonucleotide biosynthesis and its variants were identified in lower abundance in IBD and colorectal

cancer, suggesting that the downregulation of this purinergic signaling could contribute to gut inflammation [63,64].

The superpathway of GDP-mannose-derived O-antigen building blocks biosynthesis was elevated in the microbiome of SXT mice. O-antigen is part of the bacteria's outer lipopolysaccharide membrane [65], indicating elevated LPS levels in the gut. Another molecule that constitutes the LPS is Lipid A [65]. The super pathway of (Kdo)₂-lipid A biosynthesis was elevated in SXT mice, supporting the idea of Gram-negative bacteria increase in STX-treated mice. LPS produced by healthy gut microbiota has an important role in the immunotolerance of the microbial community and was reduced in SXT mice [66]. Additionally, we also observed a reduction in the super pathway of N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine, and N-acetylneuraminate degradation. When deprived of dietary fiber, the gut microbiota uses the mucus glycoproteins as a nutrient source, resulting in the degradation of the mucus layer and in the access of gut epithelial to lumen pathogens [67]. Thus, the SXT therapy might mitigate the erosion of the colonic mucus barrier in undernourished individuals by reducing the superpathway of N-acetylglucosamine, N-acetylmannosamine, and N-acetylneuraminate degradation.

Long-term cotrimoxazole prophylaxis is well recognized as having clinical benefits in HIV infection, including reducing morbidity and mortality of HIV-positive children and adults in areas with serious infectious threats [52,68]. Bourke et al. [52] showed that Cotrimoxazole reduces systemic inflammation in HIV-positive children by changing the microbiota and reducing immune and epithelial cell activation. Although gut microbiota modifications related to cotrimoxazole therapy are available in the literature, its effects in the undernourished gut microbiota and metabolic functions are still lacking. In our model, UND+SXT mice had a significant decrease in the abundance of *Sutterella* and *Adlercreutzia*. *Sutterella* has been associated with proinflammatory cytokines in digestive disorders [69]. In contrast, the presence of *Adlercreutzia* is usually associated with the restoration of health benefits in the microbiota due to its role in SCFA production and antioxidants metabolism [70]. Compared to CON, fecal microbiota of UND+SXT presented a reduction in the super pathway of sulfur oxidation. Altering this metabolic pathway has both beneficial and harmful effects for the host [71,72]. Accumulating

hydrogen sulfide (H₂S) has been linked with colonic inflammation and conditions such as colorectal cancer [73], inflammatory bowel disease (IBD), and ulcerative colitis (UC) [71]. At the same time, mice who had inhibition of H₂S synthesis presented mucosal injury and inflammation in the small intestine and colon [72], suggesting the importance of the presence of H₂S at appropriate levels. The possible H₂S accumulation could result from reducing a sulfur oxidation super pathway, which could explain the increase in the L-methionine biosynthesis III pathway observed in the same animals [74].

The UND+SXT mice also showed a reduction in the urea cycle, which intermediate metabolites could also impair intestinal epithelial barrier function [75]. The urea cycle is responsible for converting metabolic wastes from amino acid catabolism into ammonia and, subsequently, urea, and when reduced can impair intestinal epithelial barrier function [75, 76]. The Clostridiaceae family (including Clostridium) is the primary responsible for both the fermentation of amino acids into urea and the hydrolysis of urea into ammonia. The products of amino acids fermentation will act later as further support for Clostridiaceae enrichment in a healthy gut [77]. The ammonia is then used in amino acid biosynthesis while its excess is eliminated in the feces. All these pathways' synergy helps mammals to remove urea and promote homeostasis [76]. Our results showed a reduced presence of the Clostridiaceae family in UND+SXT animals, suggesting a healthy gut environment change in these animals.

Compared to healthy controls, the reduction of the amino acids' biosynthesis pathway in both UND and UND+SXT animals probably reflects the lack of food intake, which impacts cell growth. However, this lack of amino-acid synthesis could impact host physiology as up to 20% of circulating plasma lysine, body protein lysine, and urinary lysine are derived from microbial sources [78]. Besides being a precursor for protein biosynthesis [79], lysine regulates other amino acid synthesis pathways, such as arginine [80], which was also downregulated. Both lysine and arginine have been found reduced in stunted children [81]. At the same time, UND microbiota increases the pentose phosphate pathway, which could suggest a strategy to address oxidative stress using NADPH generation for detoxification [82]. When undernourished animals received SXT, the dTDP-N-acetylthomosamine biosynthesis increased, which is the pathway responsible for

producing a glycolipid common to all members of the Enterobacteriaceae [83]. Malnourished children in nutritional recovery have been reported to increase the number of antibiotic-resistant Enterobacteriaceae after amoxicillin therapy [84]. The same phenomenon could be happening in our model.

Our study is the first to evaluate the effects of SXT prophylaxis in the undernourished gut microbiota of young animals. Nonetheless, it was not exempt from important limitations. These include the evaluation of local and systemic inflammatory markers, their correlation to several observations made on the microbiome modulation of our experimental groups and the lack of experimental confirmation of the functional predictions obtained here. Additionally, a longer time of evaluation would inform the duration of the dysbiosis observed in each protocol.

4.6. Conclusions

Altogether our results present the impact of the prophylactic cotrimoxazole treatment on gut microbiota and possible consequences in host physiology in a murine model of childhood undernutrition. The controversial treatment alters gut microbiota differently from undernutrition or SXT alone, creating a third dysbiotic profile that alters metabolic pathways related to amino acid synthesis and energy production. Additional studies are necessary to determine if the functional predictions presented here affect enterocyte metabolism, intestine permeability, or taxonomic changes related to the host immune system.

Author Contributions: L.B.E. and G.F.G., designed the study, handled the animals, processed samples, analyzed the data, and wrote the manuscript. L.C.B. handled the animals and processed samples. I.M.A.d.M. handled the animals. O.B.R. and C.R.Z.B. designed the study, supervised the work, write the article and revised the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Funding: No direct funding for the execution of this study was received. L.B.E., G.F.G., and I.M.A.d.M received a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) student fellowship.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals from Brazilian College of Animal Experimentation, and approved by the Institutional Ethics Committee of Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC (protocol code 5560250219, approved on July 9th, 2019).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We are grateful to all members of the Laboratory of Applied Immunology and of the Laboratory of Immunoregulation of UFSC.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

4.7. References

1. Development Initiatives Global Nutrition Report; 2020; ISBN 978-1-9164452-6-0.
2. Giallourou, N.; Fardus-Reid, F.; Panic, G.; Veselkov, K.; McCormick, B.J.J.; Olortegui, M.P.; Ahmed, T.; Mduma, E.; Yori, P.P.; Mahfuz, M.; et al. Metabolic maturation in the first 2 years of life in resource-constrained settings and its association with postnatal growths. *Sci. Adv.* 2020, 6, 1–11, doi:10.1126/sciadv.aay5969.
3. Ibrahim, M.K.; Zambruni, M.; Melby, C.L.; Melby, P.C. Impact of childhood malnutrition on host defense and infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2017, 30, 919–971, doi:10.1128/CMR.00119-16.
4. Subramanian, S.; Huq, S.; Yatsunenkov, T.; Haque, R.; Mahfuz, M.; Alam, M.A.; Benezra, A.; DeStefano, J.; Meier, M.F.; Muegge, B.D.; et al. Persistent gut microbiota immaturity in malnourished Bangladeshi children. *Nature* 2014, 510, 417–421, doi:10.1038/nature13421.
5. Lynn, D.J.; Pulendran, B. The potential of the microbiota to influence vaccine responses. *J. Leukoc. Biol.* 2017, 103, jlb.5MR0617-216R, doi:10.1189/jlb.5MR0617-216R.
6. Kau, A.L.; Planer, J.D.; Liu, J.; Rao, S.; Yatsunenkov, T.; Trehan, I.; Manary, M.J.; Liu, T.C.; Stappenbeck, T.S.; Maleta, K.M.; et al. Functional characterization of IgA-targeted bacterial taxa from undernourished Malawian children that produce diet-dependent enteropathy. *Sci. Transl. Med.* 2015, 7, doi:10.1126/scitranslmed.aaa4877.
7. Jones, K.D.J.; Berkley, J.A. Severe acute malnutrition and infection. *Paediatr. Int. Child Health* 2014, 34, S1–S29, doi:10.1179/2046904714Z.000000000218.
8. Organization, W.H. Management of severe malnutrition: a manual for physicians and other senior health workers. World Heal. Organ. 1999.
9. Williams, P.C.M.; Berkley, J.A. Sever Acute Malnutrition Update: Current WHO Guidelines and the WHO Essential Medicine List for Children. *Who* 2016, 1–40.
10. Berkley, J.A.; Ngari, M.; Thitiri, J.; Mwalekwa, L.; Timbwa, M.; Hamid, F.; Ali, R.; Shangala, J.; Mturi, N.; Jones, K.D.J.; et al. Daily co-trimoxazole prophylaxis to prevent mortality in children with complicated severe acute malnutrition: A multicentre, double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet Glob. Heal.* 2016, 4, e464–e473, doi:10.1016/S2214-109X(16)30096-1.
11. Laxminarayan, R.; Duse, A.; Wattal, C.; Zaidi, A.K.M.; Wertheim, H.F.L.; Sumpradit, N.; Vlieghe, E.; Hara, G.L.; Gould, I.M.; Goossens, H.; et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect. Dis.* 2013, 13, 1057–1098, doi:10.1016/S1473-3099(13)70318-9.

12. Ramirez, J.; Guarner, F.; Bustos Fernandez, L.; Maruy, A.; Sdepanian, V.L.; Cohen, H. Antibiotics as Major Disruptors of Gut Microbiota. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020, 10, 1–10, doi:10.3389/fcimb.2020.572912.
13. Jones, K.D.; Thitiri, J.; Ngari, M.; Berkley, J.A. Childhood malnutrition: Toward an understanding of infections, inflammation, and antimicrobials. *Food Nutr. Bull.* 2014, 35, S64–S70, doi:10.1177/15648265140352S110.
14. Mittal, A.; Woodward, B. Thymic Epithelial Cells of Severely Undernourished Mice: Accumulation of Cholesteryl Esters and Absence of Cytoplasmic Vacuoles. *Exp. Biol. Med.* 1985, 178, 385–391, doi:10.3181/00379727-178-42021.
15. Yu, Y.; Lee, C.; Kim, J.; Hwang, S. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol. Bioeng.* 2005, 89, 670–679, doi:10.1002/bit.20347.
16. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014, 30, 2114–2120, doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
17. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 2016, 13, 581–583, doi:10.1038/nmeth.3869.
18. Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.C.; Al-Ghalith, G.A.; Alexander, H.; Alm, E.J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 2019, 37, 852–857, doi:10.1038/s41587-019-0209-9.
19. DeSantis, T.Z.; Hugenholtz, P.; Larsen, N.; Rojas, M.; Brodie, E.L.; Keller, K.; Huber, T.; Dalevi, D.; Hu, P.; Andersen, G.L. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 5069–5072, doi:10.1128/AEM.03006-05.
20. Rognes, T.; Flouri, T.; Nichols, B.; Quince, C.; Mahé, F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 2016, 4, e2584, doi:10.7717/peerj.2584.
21. Douglas, G.M.; Maffei, V.J.; Zaneveld, J.R.; Yurgel, S.N.; Brown, J.R.; Taylor, C.M.; Huttenhower, C.; Langille, M.G.I. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nat. Biotechnol.* 2020, 38, 685–688, doi:10.1038/s41587-020-0548-6.
22. R Core Team The R project for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing website. Available online: www.R-project.org (accessed on Nov 10, 2021).

23. McMurdie, P.J.; Holmes, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 2013, 8, e61217, doi:10.1371/journal.pone.0061217.
24. Oksanen, J.; Blanchet, F.G.; Friendly, M.; Kindt, R.; Legendre, P.; McGlinn, D.; Minchin, P.R.; O'Hara, R.B.; Simpson, G.L.; Solymos, P.; et al. *vegan*: Community Ecology Package Available online: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html> (accessed on Nov 10, 2021).
25. Anderson, M.J.; Walsh, D.C.I. PERMANOVA, ANOSIM, and the Mantel test in the face of heterogeneous dispersions: What null hypothesis are you testing? *Ecol. Monogr.* 2013, 83, 557–574, doi:10.1890/12-2010.1.
26. Segata, N.; Izard, J.; Waldron, L.; Gevers, D.; Miropolsky, L.; Garrett, W.S.; Huttenhower, C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011, 12, R60, doi:10.1186/gb-2011-12-6-r60.
27. Dinh, D.M.; Ramadass, B.; Kattula, D.; Sarkar, R.; Braunstein, P.; Tai, A.; Wanke, C.A.; Hassoun, S.; Kane, A. V.; Naumova, E.N.; et al. Longitudinal Analysis of the Intestinal Microbiota in Persistently Stunted Young Children in South India. *PLoS One* 2016, 11, e0155405, doi:10.1371/journal.pone.0155405.
28. Million, M.; Tidjani Alou, M.; Khelafia, S.; Bachar, D.; Lagier, J.C.; Dione, N.; Brah, S.; Hugon, P.; Lombard, V.; Armougom, F.; et al. Increased Gut Redox and Depletion of Anaerobic and Methanogenic Prokaryotes in Severe Acute Malnutrition. *Sci. Rep.* 2016, 6, 1–11, doi:10.1038/srep26051.
29. Smith, M.I.; Yatsunenko, T.; Manary, M.J.; Trehan, I.; Mkakosya, R.; Cheng, J.; Kau, A.L.; Rich, S.S.; Concannon, P.; Mychaleckyj, J.C.; et al. Gut Microbiomes of Malawian Twin Pairs Discordant for Kwashiorkor. *Science (80-.)*. 2013, 339, 548–554, doi:10.1126/science.1229000.
30. Monira, S.; Nakamura, S.; Gotoh, K.; Izutsu, K.; Watanabe, H.; Alam, N.H.; Endtz, H.P.; Cravioto, A.; Ali, S.I.; Nakaya, T.; et al. Gut Microbiota of Healthy and Malnourished Children in Bangladesh. *Front. Microbiol.* 2011, 2, 1–7, doi:10.3389/fmicb.2011.00228.
31. Goodrich, J.K.; Waters, J.L.; Poole, A.C.; Sutter, J.L.; Koren, O.; Blekhman, R.; Beaumont, M.; Treuren, W. Van; Knight, R.; Bell, J.T.; et al. Article Human Genetics Shape the Gut Microbiome. *Cell* 2014, 159, 789–799, doi:10.1016/j.cell.2014.09.053.
32. Tims, S.; Derom, C.; Jonkers, D.M.; Vlietinck, R.; Saris, W.H.; Kleerebezem, M.; Vos, W.M. De; Zoetendal, E.G. Microbiota conservation and BMI signatures in adult monozygotic twins. *ISME J.* 2013, 707–717, doi:10.1038/ismej.2012.146.
33. Walters, W.A.; Xu, Z.; Knight, R. Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Lett.* 2014, 588, 4223–4233, doi:10.1016/j.febslet.2014.09.039.

34. Wells, J.C.; Sawaya, A.L.; Wibaek, R.; Mwangome, M.; Poullas, M.S.; Yajnik, C.S.; Demaio, A. The double burden of malnutrition: aetiological pathways and consequences for health. *Lancet* 2020, 395, 75–88, doi:10.1016/S0140-6736(19)32472-9.
35. Prendergast, A.J.; Rukobo, S.; Chasekwa, B.; Mutasa, K.; Ntozini, R.; Mbuya, M.N.N.; Jones, A.; Moulton, L.H.; Stoltzfus, R.J.; Humphrey, J.H. Stunting Is Characterized by Chronic Inflammation in Zimbabwean Infants. *PLoS One* 2014, 9, e86928, doi:10.1371/journal.pone.0086928.
36. Blanton, L. V.; Barratt, M.J.; Charbonneau, M.R.; Ahmed, T.; Gordon, J.I. Childhood undernutrition, the gut microbiota, and microbiota-directed therapeutics. *Science* (80). 2016, 352, 1533–1533, doi:10.1126/science.aad9359.
37. Preidis, G.A.; Ajami, N.J.; Wong, M.C.; Bessard, B.C.; Conner, M.E.; Petrosino, J.F. Composition and function of the undernourished neonatal mouse intestinal microbiome. *J. Nutr. Biochem.* 2015, 26, 1050–1057, doi:10.1016/j.jnutbio.2015.04.010.
38. Zhang, Z.; Cao, H.; Song, N.; Zhang, L.; Cao, Y.; Tai, J. Long-term hexavalent chromium exposure facilitates colorectal cancer in mice associated with changes in gut microbiota composition. *Food Chem. Toxicol.* 2020, 138, 111237, doi:10.1016/j.fct.2020.111237.
39. Wu, H.; Chen, Q.; Liu, J.; Chen, X.; Luo, H.; Ye, Z.; Liu, J. Microbiome analysis reveals gut microbiota alteration in mice with the effect of matrine. *Microb. Pathog.* 2021, 156, 104926, doi:10.1016/j.micpath.2021.104926.
40. Wang, Y.; Weng, P.; Wan, H.; Zhang, W.; Chen, C.; Chen, Y.; Cai, Y.; Guo, M.; Xia, F.; Wang, N.; et al. Economic Status Moderates the Association Between Early-Life Famine Exposure and Hyperuricemia in Adulthood. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2020, 105, doi:10.1210/clinem/dgaa523.
41. Shi, Z.; Nicholls, S.J.; Taylor, A.W.; Magliano, D.J.; Appleton, S.; Zimmet, P. Early life exposure to Chinese famine modifies the association between hypertension and cardiovascular disease. *J. Hypertens.* 2018, 36, 54–60, doi:10.1097/HJH.0000000000001496.
42. Hediger, M.A.; Johnson, R.J.; Miyazaki, H.; Endou, H. Molecular Physiology of Urate Transport. *Physiology* 2005, 20, 125–133, doi:10.1152/physiol.00039.2004.
43. Chu, Y.; Sun, S.; Huang, Y.; Gao, Q.; Xie, X.; Wang, P.; Li, J.; Liang, L.; He, X.; Jiang, Y.; et al. Metagenomic analysis revealed the potential role of gut microbiome in gout. *npj Biofilms Microbiomes* 2021, 7, doi:10.1038/s41522-021-00235-2.
44. Zhao, X.; Zhang, Z.; Hu, B.; Huang, W.; Yuan, C.; Zou, L. Response of gut microbiota to metabolite changes induced by endurance exercise. *Front. Microbiol.* 2018, 9, 1–11, doi:10.3389/fmicb.2018.00765.

45. Kunisawa, J.; Hashimoto, E.; Ishikawa, I.; Kiyono, H. A pivotal role of vitamin B9 in the maintenance of regulatory T cells in vitro and in vivo. *PLoS One* 2012, 7, 1–6, doi:10.1371/journal.pone.0032094.
46. Hirata, S. ichiro; Kunisawa, J. Gut microbiome, metabolome, and allergic diseases. *Allergol. Int.* 2017, 66, 523–528, doi:10.1016/j.alit.2017.06.008.
47. Reddy, P.; Leong, J.; Jialal, I. Amino acid levels in nascent metabolic syndrome: A contributor to the pro-inflammatory burden. *J. Diabetes Complications* 2018, 32, 465–469, doi:10.1016/j.jdiacomp.2018.02.005.
48. Ciliberto, M.A.; Sandige, H.; Ndekha, M.J.; Ashorn, P.; Briend, A.; Ciliberto, H.M.; Manary, M.J. Comparison of home-based therapy with ready-to-use therapeutic food with standard therapy in the treatment of malnourished Malawian children: A controlled, clinical effectiveness trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005, 81, 864–870, doi:10.1093/ajcn/81.4.864.
49. Bahwere, P.; Levy, J.; Hennart, P.; Donnen, P.; Lomoyo, W.; Dramaix-Wilmet, M.; Hemelof, W.; Butzler, J.P.; De Mol, P. Community-acquired bacteremia among hospitalized children in rural central Africa. *Int. J. Infect. Dis.* 2001, 5, 180–188, doi:10.1016/S1201-9712(01)90067-0.
50. Berkley, J.A.; Lowe, B.S.; Mwangi, I.; Williams, T.; Bauni, E.; Mwarumba, S.; Ngetsa, C.; Slack, M.P.E.; Njenga, S.; Hart, C.A.; et al. Bacteremia among Children Admitted to a Rural Hospital in Kenya. *N. Engl. J. Med.* 2005, 352, 39–47, doi:10.1056/nejmoa040275.
51. D’Souza, A.W.; Moodley-Govender, E.; Berla, B.; Kelkar, T.; Wang, B.; Sun, X.; Daniels, B.; Coutsoudis, A.; Trehan, I.; Dantas, G. Cotrimoxazole Prophylaxis Increases Resistance Gene Prevalence and α -Diversity but Decreases β -Diversity in the Gut Microbiome of Human Immunodeficiency Virus–Exposed, Uninfected Infants. *Clin. Infect. Dis.* 2020, 71, 2858–2868, doi:10.1093/cid/ciz1186.
52. Bourke, C.D.; Gough, E.K.; Pimundu, G.; Shonhai, A.; Berejena, C.; Terry, L.; Baumard, L.; Choudhry, N.; Karmali, Y.; Bwakura-Dangarembizi, M.; et al. Cotrimoxazole reduces systemic inflammation in HIV infection by altering the gut microbiome and immune activation. *Sci. Transl. Med.* 2019, 11, 1–14, doi:10.1126/scitranslmed.aav0537.
53. Willmann, M.; Vehreschild, M.J.G.T.; Biehl, L.M.; Vogel, W.; Dörfel, D.; Hamprecht, A.; Seifert, H.; Autenrieth, I.B.; Peter, S. Distinct impact of antibiotics on the gut microbiome and resistome: A longitudinal multicenter cohort study. *BMC Biol.* 2019, 17, 1–18, doi:10.1186/s12915-019-0692-y.
54. Panda, S.; El Khader, I.; Casellas, F.; López Vivancos, J.; García Cors, M.; Santiago, A.; Cuenca, S.; Guarner, F.; Manichanh, C. Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota. *PLoS One* 2014, 9, doi:10.1371/journal.pone.0095476.

55. Million, M.; Diallo, A.; Raoult, D. Gut microbiota and malnutrition. *Microb. Pathog.* 2017, 106, 127–138, doi:10.1016/j.micpath.2016.02.003.
56. Coretti, L.; Cristiano, C.; Florio, E.; Scala, G.; Lama, A.; Keller, S.; Cuomo, M.; Russo, R.; Pero, R.; Paciello, O.; et al. Sex-related alterations of gut microbiota composition in the BTBR mouse model of autism spectrum disorder. *Sci. Rep.* 2017, 7, 45356, doi:10.1038/srep45356.
57. Chandra, S.; Kronenberg, M. *Activation and Function of iNKT and MAIT Cells*; 1st ed.; Elsevier Inc., 2015; Vol. 127; ISBN 9780128022450.
58. Sriram, V.; Du, W.; Gervay-Hague, J.; Brutkiewicz, R.R. Cell wall glycosphingolipids of *Sphingomonas paucimobilis* are CD1d-specific ligands for NKT cells. *Eur. J. Immunol.* 2005, 35, 1692–1701, doi:10.1002/eji.200526157.
59. Brenner, D.J.; Farmer, J.J. Enterobacteriaceae. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*; Wiley, 2015; pp. 1–24 ISBN 9781118960608.
60. Huda, M.N.; Lewis, Z.; Kalanetra, K.M.; Rashid, M.; Ahmad, S.M.; Raqib, R.; Qadri, F.; Underwood, M.A.; Mills, D.A.; Stephensen, C.B. Stool microbiota and vaccine responses of infants. *Pediatrics* 2014, 134, doi:10.1542/peds.2013-3937.
61. Mu, C.; Zhu, W. Antibiotic effects on gut microbiota, metabolism, and beyond. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019, 103, 9277–9285, doi:10.1007/s00253-019-10165-x.
62. Byndloss, M.X.; Olsan, E.E.; Rivera-Chávez, F.; Tiffany, C.R.; Cevallos, S.A.; Lokken, K.L.; Torres, T.P.; Byndloss, A.J.; Faber, F.; Gao, Y.; et al. Microbiota-activated PPAR- γ signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science* (80-). 2017, 357, 570–575, doi:10.1126/science.aam9949.
63. Longhi, M.S.; Moss, A.; Jiang, Z.G.; Robson, S.C. Purinergic signaling during intestinal inflammation. *J. Mol. Med.* 2017, 95, 915–925, doi:10.1007/s00109-017-1545-1.
64. Ma, Y.; Zhang, Y.; Xiang, J.; Xiang, S.; Zhao, Y.; Xiao, M.; Du, F.; Ji, H.; Kaboli, P.J.; Wu, X.; et al. Metagenome Analysis of Intestinal Bacteria in Healthy People, Patients With Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021, 11, 1–12, doi:10.3389/fcimb.2021.599734.
65. Delcour, A.H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 2009, 1794, 808–816, doi:10.1016/j.bbapap.2008.11.005.
66. Vatanen, T.; Kostic, A.D.; D'Hennezel, E.; Siljander, H.; Franzosa, E.A.; Yassour, M.; Kolde, R.; Vlamakis, H.; Arthur, T.D.; Hämäläinen, A.M.; et al. Variation in Microbiome LPS Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans. *Cell* 2016, 165, 842–853, doi:10.1016/j.cell.2016.04.007.

67. Desai, M.S.; Seekatz, A.M.; Koropatkin, N.M.; Kamada, N.; Hickey, C.A.; Wolter, M.; Pudlo, N.A.; Kitamoto, S.; Terrapon, N.; Muller, A.; et al. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell* 2016, 167, 1339-1353.e21, doi:10.1016/j.cell.2016.10.043.
68. Gebru, T.H.; Mekonen, H.H.; Kiros, K.G. Undernutrition and associated factors among adult HIV/AIDS patients receiving antiretroviral therapy in eastern zone of Tigray, Northern Ethiopia: a cross-sectional study. *Arch. Public Heal.* 2020, 78, 1–8, doi:10.1186/s13690-020-00486-z.
69. Ma, S.; Qian, C.; Li, N.; Fang, Z.; Zhao, J.; Zhang, H.; Chen, W.; Liu, Z.; Lu, W. Protein diets with the role of immune and gut microbial regulation alleviate DSS-induced chronic ulcerative colitis. *Food Sci. Nutr.* 2021, 9, 1259–1270, doi:10.1002/fsn3.1914.
70. Tidjani Alou, M.; Million, M.; Traore, S.I.; Mouelhi, D.; Khelaifia, S.; Bachar, D.; Caputo, A.; Delerce, J.; Brah, S.; Alhousseini, D.; et al. Gut Bacteria Missing in Severe Acute Malnutrition, Can We Identify Potential Probiotics by Culturomics? *Front. Microbiol.* 2017, 8, 1–17, doi:10.3389/fmicb.2017.00899.
71. Levine, J.; Ellis, C.J.; Furne, J.K.; Springfield, J.; Levitt, M.D. Fecal hydrogen sulfide production in ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* 1998, 93, 83–87, doi:10.1111/j.1572-0241.1998.083_c.x.
72. Wallace, J.L.; Vong, L.; McKnight, W.; Dickey, M.; Martin, G.R. Endogenous and Exogenous Hydrogen Sulfide Promotes Resolution of Colitis in Rats. *Gastroenterology* 2009, 137, 569-578.e1, doi:10.1053/j.gastro.2009.04.012.
73. Ramasamy, S.; Singh, S.; Taniere, P.; Langman, M.J.S.; Eggo, M.C. Sulfide-detoxifying enzymes in the human colon are decreased in cancer and upregulated in differentiation. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 2006, 291, 288–296, doi:10.1152/ajpgi.00324.2005.
74. Soda, K. Microbial Sulfur Amino Acids: An Overview. *Methods Enzymol.* 1987, 143, 453–459, doi:10.1016/0076-6879(87)43080-2.
75. Vaziri, N.D.; Yuan, J.; Rahimi, A.; Ni, Z.; Said, H.; Subramanian, V.S. Disintegration of colonic epithelial tight junction in uremia: A likely cause of CKD-associated inflammation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2012, 27, 2686–2693, doi:10.1093/ndt/gfr624.
76. Afolayan, A.O.; Adebuseye, L.A.; Cadmus, E.O.; Ayeni, F.A. Insights into the gut microbiota of Nigerian elderly with type 2 diabetes and non-diabetic elderly persons. *Heliyon* 2020, 6, e03971, doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03971.

77. Ramezani, A.; Massy, Z.A.; Meijers, B.; Evenepoel, P.; Vanholder, R.; Raj, D.S. Role of the gut microbiome in Uremia: A potential therapeutic target. *Am. J. Kidney Dis.* 2016, 67, 483–498, doi:10.1053/j.ajkd.2015.09.027.
78. Metges, C.C. Contribution of microbial amino acids to amino acid homeostasis of the host. *J. Nutr.* 2000, 130, 1857–1864, doi:10.1093/jn/130.7.1857s.
79. Tomé, D.; Bos, C. Lysine requirement through the human life cycle. *J. Nutr.* 2007, 137, 9–12, doi:10.1093/jn/137.6.1642s.
80. Wu, G. Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 2009, 37, 1–17, doi:10.1007/s00726-009-0269-0.
81. Kumar, M.; Ji, B.; Babaei, P.; Das, P.; Lappa, D.; Ramakrishnan, G.; Fox, T.E.; Haque, R.; Petri, W.A.; Bäckhed, F.; et al. Gut microbiota dysbiosis is associated with malnutrition and reduced plasma amino acid levels: Lessons from genome-scale metabolic modeling. *Metab. Eng.* 2018, 49, 128–142, doi:10.1016/j.ymben.2018.07.018.
82. Laue, H.E.; Korrick, S.A.; Baker, E.R.; Karagas, M.R.; Madan, J.C. Prospective associations of the infant gut microbiome and microbial function with social behaviors related to autism at age 3 years. *Sci. Rep.* 2020, 10, 1–11, doi:10.1038/s41598-020-72386-9.
83. Meier-Dieter, U.; Starman, R.; Barr, K.; Mayer, H.; Rick, P.D. Biosynthesis of enterobacterial common antigen in *Escherichia coli*. Biochemical characterization of Tn10 insertion mutants defective in enterobacterial common antigen synthesis. *J. Biol. Chem.* 1990, 265, 13490–13497, doi:10.1016/s0021-9258(18)77373-0.
84. Maataoui, N.; Langendorf, C.; Berthe, F.; Bayjanov, J.R.; Van Schaik, W.; Isanaka, S.; Grais, R.F.; Clermont, O.; Andremont, A.; Armand-Lefèvre, L.; et al. Increased risk of acquisition and transmission of ESBL-producing Enterobacteriaceae in malnourished children exposed to amoxicillin. *J. Antimicrob. Chem*

CAPÍTULO II

O segundo capítulo da tese buscou acompanhar a longo prazo o quadro de desnutrição em camundongos C57BL/6. Quadros de desnutrição durante a infância estão correlacionados com doenças metabólicas na vida adulta. Além disso, alterações no sistema imune são relatadas em casos de desnutrição e como consequências do uso de antibióticos. Entretanto, poucos estudos demonstram a correlação da composição e da funcionalidade da microbiota intestinal de crianças desnutridas com efeitos na vida adulta. O presente capítulo buscou elucidar os efeitos a longo prazo da desnutrição em camundongos C57BL/6.

Avaliação dos efeitos a curto e a longo prazo na composição da microbiota intestinal e sua repercussão funcional em modelo murino de desnutrição infantil energético-proteica.

5.1 INTRODUÇÃO

A vacinação está entre uma das medidas de maior impacto na saúde pública, sendo capaz de prevenir milhões de novas infecções e mortes anualmente (FISCHINGER et al., 2019). Desde 1980, a vacinação é responsável pela erradicação de diversas doenças associadas a infecções por vírus e por bactérias como, por exemplo, a varíola, o vírus da poliomielite e a *Haemophilus influenzae* tipo b (RÉMY; ZÖLLNER; HECKMANN, 2015). A proteção seguida da vacinação depende de uma resposta coordenada por diversos componentes do sistema imune (FISCHINGER et al., 2019). A resposta imune inata e os perfis de células T CD4 estão associados com a estimulação de uma proteção duradoura e a erradicação de patógenos, enquanto a estimulação de anticorpos representa a primeira resposta clínica de proteção e atua em sinergia com os demais componentes imunológicos (PLOTKIN, 2010). Entretanto, a resposta imune a vacinação pode variar substancialmente entre indivíduos (ZIMMERMANN; CURTIS, 2018). A resposta sorológica para algumas vacinas, como a vacina da hepatite B por exemplo, pode variar cerca de 100 vezes em crianças de até 7 meses, sendo que algumas crianças podem não apresentar anticorpos detectáveis (JUNQUEIRA et al., 2010). O uso de vacinas orais em países de baixa renda geralmente está associado com grandes variações na estimulação da resposta imune, resultando em baixa eficácia na imunização (LOPMAN et al., 2012; MAGWIRA; TAYLOR, 2018; PARKER et al., 2018). Vacina oral contra o rotavírus apresenta 90% de eficácia em populações de países desenvolvidos, enquanto esse índice cai para 30-40% em países em desenvolvimento (LOPMAN et al., 2012). A eficácia da vacinação oral está intimamente correlacionada com uma imunidade de mucosa intestinal insuficiente, o que pode resultar em aumento da susceptibilidade a doenças infecciosas no intestino e a morte (RHO et al., 2017). Diversos fatores já foram associados como contribuintes para essas oscilações na resposta imunológica, entre eles se destacam: idade, sexo, genética, localização geográfica, status nutricional, microbiota, entre outros (KLEIN; FLANAGAN,

2016; LYNN; PULENDRAN, 2017; MAGWIRA; TAYLOR, 2018; MARTINS et al., 2014; PARK et al., 2014; POSTERARO et al., 2014).

Nos últimos anos, a microbiota intestinal vem ganhando destaque devido ao seu papel fundamental no desenvolvimento e na modulação do sistema imune (ZEEVI; KOREM; SEGAL, 2016). A abundância de determinadas taxa presentes na microbiota intestinal já foram correlacionadas com uma série de alterações na saúde humana como, por exemplo, a sepse neonatal, doenças inflamatórias do intestino, diabetes mellitus, alergias, entre outras (KNIP; SILJANDER, 2016; MADAN et al., 2012; MANICHANH et al., 2006; ZIMMERMANN et al., 2019). Além de influenciar diretamente o sistema imune através do reconhecimento de padrões moleculares presentes na microbiota, essa comunidade pode alterar a resposta imune por meio de mudanças nas vias metabólicas ativas e, conseqüentemente, nos metabólitos produzidos (LYNN; PULENDRAN, 2017). Diversos metabólitos apresentam propriedades imunomodulatórias, capazes de influenciar respostas de macrófagos, células dendríticas, células T e células B (DORRESTEIN; MAZMANIAN; KNIGHT, 2014).

Entretanto, uma série de fatores é capaz de influenciar na composição da microbiota intestinal, sendo uma delas a desnutrição. A desnutrição proteico-energética é definida como a deficiência energética como resultado do consumo inadequado de nutrientes (PREIDIS et al., 2015). A desnutrição continua sendo considerada um dos maiores problemas de saúde em países de baixa renda e é caracterizada como a causa mais comum de imunodeficiência secundária (RHO et al., 2017). Crianças com nutrição insuficiente ou inadequada são mais susceptíveis a infecções e a doenças endêmicas (TAYLOR et al., 2013). Os efeitos a longo prazo da desnutrição durante a infância incluem a deficiência no crescimento linear, na eficácia de vacinas, nas habilidades cognitivas e produtividade econômica, além de aumento no risco de obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares (DEWEY; BEGUM, 2011).

Nesse estudo, nós reproduzimos a desnutrição infantil e o protocolo de recuperação alimentar em modelos murinos com a finalidade de avaliar os efeitos da desnutrição na composição e funcionalidade da microbiota intestinal a longo prazo. Além disso, buscamos identificar o comportamento do sistema imune após a desnutrição e

associar a microbiota intestinal com possíveis alterações na imunidade. Nossos resultados demonstram que os efeitos da desnutrição se repercutem até na vida adulta, alterando o metabolismo dos animais e a resposta imune.

5.2 METODOLOGIA

5.2.1 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram realizados em camundongos de acordo com as normas internacionais e em consonância com os princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O projeto obteve parecer favorável pelo CEUA da UFSC e está cadastrado sob o número 5560250219. A Figura 6 resume o delineamento experimental descrito abaixo.

Camundongos C57BL/6 machos e fêmeas, com idade superior a 3-4 semanas, foram mantidos na área de experimentação do Biotério Setorial do MIP (BS-MIP), onde foram distribuídos em microisoladores com no máximo 3 animais por caixa, maravalha esterilizada e controle de condições ambientais, com temperatura de 21 °C (± 1 °C), ciclos de luz de 12 h e umidade controlada ($50 \pm 20\%$). Antes do início dos experimentos, todos animais passaram por período de aclimação de 4 dias para recuperação do estresse do transporte. Durante o período de aclimação, os animais tiveram acesso *ad libitum* a água destilada esterilizada e a alimentação irradiada.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais: grupo controle (CON) com 6 animais, grupo que recebeu apenas a vacina (VZV) com 6 animais, grupo desnutrido e recuperado (UND) com 6 animais, grupo desnutrido e recuperado que recebeu a vacina (UND+VZV) com 6 animais. Além disso, foi realizada uma subdivisão entre gêneros, sendo que cada grupo experimental com n de 6 foi composto por 3 camundongos machos e 3 camundongos fêmeas.

O modelo de desnutrição empregado foi adaptado do modelo descrito por Mittal e Woodward (1985), sendo que camundongos dos grupos desnutridos UND e UND+VZV receberam dietas com redução de 40% da ração total consumida pelos grupos CON e VZV,

ou seja, esses animais consumiram diariamente apenas 60% do total consumido por um animal controle. As quantidades de alimentação recebida por esses animais, foi previamente estabelecida de forma diária através do acompanhamento do desenvolvimento de animais saudáveis cujos pesos, assim como o peso da ração consumida diariamente, foi auferida previamente e estão descritos em Gubert (2020). Além disso, a ração disponível para consumo dos animais desnutridos UND e VZV foi adequada de acordo com o gênero, dessa forma os camundongos machos consumiam diariamente 1,7 g de ração por animal e as fêmeas consumiam 1,4 g de ração por animal. O período de desnutrição para esses grupos foi mantido durante três semanas. Com relação a disponibilidade de alimento para os animais dos grupos controle CON e VZV, essa foi realizada *ad libitum*.

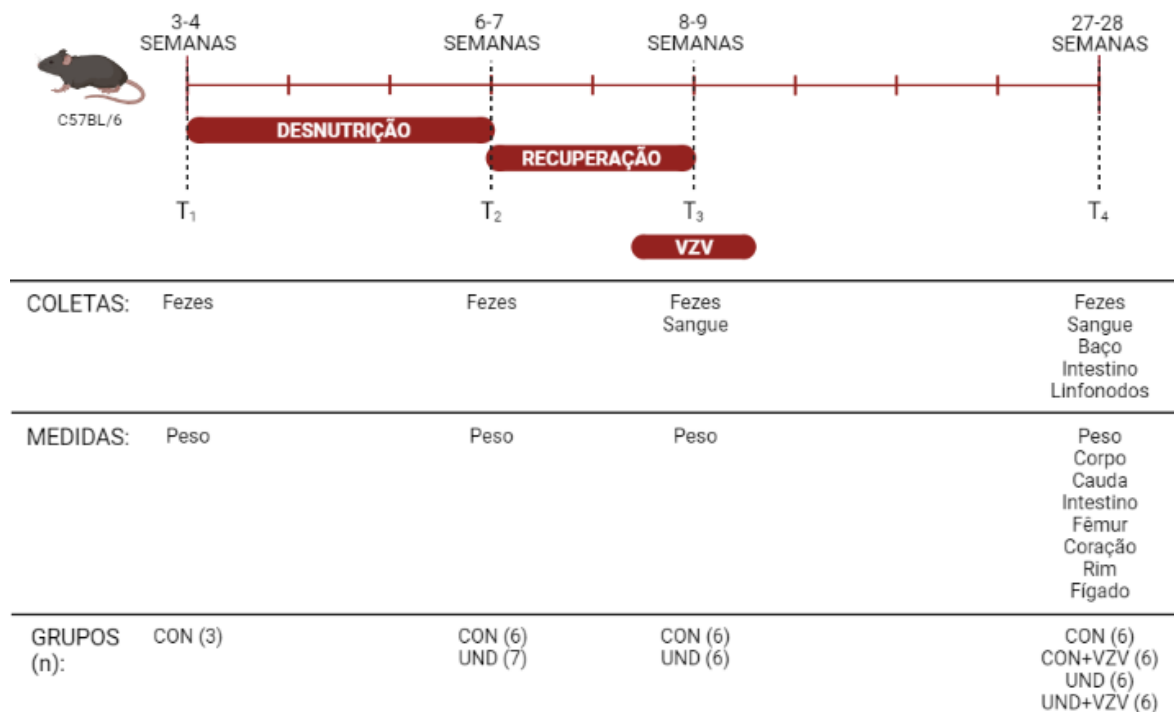
Após o período de desnutrição, quando os animais apresentavam cerca de 6-7 semanas de idade, foi realizado um período de recuperação e reestabelecimento da alimentação para os grupos desnutridos UND e UND+VZV. Esse período de recuperação ocorreu ao longo de duas semanas, nas quais foi reintroduzido progressivamente o aumento na alimentação disponível. Camundongos machos receberam, a cada dois dias, um aumento de cerca de 0,5 g na alimentação, já as fêmeas receberam um aumento de 0,4 g na alimentação a cada dois dias. Ao final das duas semanas de recuperação, a alimentação foi disponibilizada de modo *ad libitum*.

A vacinação dos animais dos grupos VZV e UND+VZV foi realizada no final do período de recuperação. Cada grupo vacinado recebeu uma dose intramuscular (I.M.) da vacina comercial liofilizada do vírus da varicela-zoster cepa Oka vivo atenuado, Varilrix® (GlaxoSmithKline), cada dose contém no mínimo 2000 unidades formadoras de placa (UFP). Cada camundongo dos grupos vacinados recebeu cerca de 334 partículas virais em 100 µL de solução salina 0,9% via I.M.

Para análise da microbiota, foram coletadas amostras de fezes em pontos específicos do experimento, os quais são: dia 0, condizendo com o início do experimento (T1); dia 21, final da desnutrição (T2); dia 35, final da recuperação e administração da vacina (T3); dia 189, final do experimento (T4). A coleta de fezes foi realizada de maneira espontânea através da aproximação de tubos estéreis de 1,5 mL do ânus dos animais. Após a coleta, o material foi armazenado a -80 °C para posterior extração de DNA.

Ao final da experimentação, os animais foram anestesiados com solução contendo 25 $\mu\text{L/g}$ de cetamina e 17 $\mu\text{L/g}$ de xilazina por via intraperitoneal (I.P.), sendo realizada a medição do comprimento do corpo e da cauda desses animais. Posteriormente, os animais passaram pelo procedimento de eutanásia por deslocamento cervical para coleta e medição de órgãos internos. As medidas anotadas foram do tamanho, em centímetros, do intestino grosso e delgado e do fêmur e o peso, em gramas, do coração, rim e fígado. O baço dos animais foi coletado em procedimento asséptico para posterior cultivo celular. Além disso, os linfonodos mesentéricos e inguinais e o intestino grosso e delgado foram coletados e fixados em paraformaldeído 4% tamponado (pH 7,2) durante 24 h. Logo após a fixação, os órgãos foram lavados 3 vezes em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,2) e armazenados em solução salina 0,9% para posterior análise histológica.

Figura 6. Representação do delineamento experimental do capítulo 2.



Fonte: Eslabão (2021)

Legenda. Delineamento experimental destacando os pontos principais na experimentação, como a desnutrição, a recuperação, a vacinação e o final do experimento, em relação a

idade (semanas) dos animais e o tempo experimental. Ênfase para as coletas e para as medidas analisadas durante a experimentação.

5.2.2 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DAS FEZES

A extração de DNA total das fezes dos animais foi realizada com o FastDNA™ SPIN Kit (MP Biomedicals™, Thermo Fisher Scientific) de acordo com as especificações do fabricante. Brevemente, as amostras de fezes foram pesadas e adicionadas no tubo *Lysing Matrix A* fornecido no kit. Logo após, foi adicionado 1 mL de solução de lise celular para bactérias, homogeneizado por vortex e centrifugado a 14000 x g por 10 min. Cerca de 700 µL de sobrenadante foi coletado, transferido para um tubo 2 mL contendo um volume igual de *Binding Matrix* e incubado por 5 min em temperatura ambiente sob leve agitação. A suspensão foi transferida para um filtro SPIN™ e centrifugada a 14000 x g por 1 min. Em seguida, o pellet retido no filtro foi suspenso com a adição de 500 µL da solução SEWS-M e centrifugado a 14000 x g por 1 min. Para remover totalmente a solução SEWS-M, uma nova etapa de centrifugação a 14000 x g por 2 min foi realizada. Por último, o DNA foi eluído pela adição de 100 µL de solução DES suspendendo a *Binding Matrix* retida no filtro e centrifugando as amostras a 14000 x g por 1 min.

O DNA foi quantificado através de fluorimetria com o Qubit™ (Thermo Fisher Scientific) utilizando o Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific). Para a quantificação foi preparada uma solução de trabalho com o Qubit™ dsDNA BR Reagent diluído 1:200 em Qubit™ dsDNA BR Buffer. O volume final para análise de cada amostra e cada padrão foi de 200 µL, sendo 190 µL de solução de trabalho e 10 µL de amostra ou padrão. As amostras foram homogeneizadas por vortex e incubadas por 2 min em temperatura ambiente. Logo em seguida foi realizada a leitura das curvas padrões e das amostras, estabelecendo a concentração de DNA contido em cada uma. As amostras foram então armazenadas a -20 °C.

5.2.3 SEQUENCIAMENTO DO rRNA 16S

5.2.3.1 SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento do gene rRNA 16S foi realizado pela empresa GenOne Biotech (Rio de Janeiro, Brazil). Para a geração do amplicon representativo das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA foram utilizados primers 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') e 806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3') associados a sequências barcode conforme descrito por Yu et al. (2005). A amplificação por PCR foi realizada utilizando 15 µL de Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs), 0,2 µM de primers forward e reverse, e cerca de 10 ng de DNA template. As condições da amplificação foram 98°C por 1 min para desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 98°C por 10 s, anelamento a 50°C por 30s e extensão a 72°C por 60s, além de um passo de extensão final a 72°C por 5 min.

A quantificação e análise de qualidade da amplificação por PCR foi realizada em por eletroforese em gel de agarose à 2%, no qual o produto proveniente do PCR foi misturado em volumes iguais de loading buffer contendo SYB green. Apenas as amostras que apresentaram bandas intensas entre 400 e 450 pb foram selecionadas. Os produtos provenientes do PCR foram misturados em razões de equidensidade. Por fim, os produtos foram purificados com Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. As bibliotecas para o sequenciamento foram geradas utilizando o TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit (Illumina), seguindo as recomendações do fabricante, e adicionando os adaptadores. A qualidade da biblioteca foi acessada através de fluorometria com o Qubit™ 2.0 (Thermo Fisher Scientific) e por eletroforese através do sistema 2100 Bionalyzer (Agilent). O sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina HiSeq 2500 (Illumina, Inc.), resultando na geração de *paired-end reads* de 250 pb.

5.2.3.2 ANÁLISE METAGENÔMICA

Para as análises de metagenômica foram selecionadas as sequências previamente trimadas pela empresa Genone Biotechnologies, das quais foram removidas das sequências finais referentes aos adaptadores. A análise de qualidade das sequências foi realizada utilizando FastQC. Sequências de baixa qualidade com tamanho inferior a 200 e com valor de *phred score* menor que 33 foram filtradas e retiradas da análise através da ferramenta Trimmomatic versão 0.36 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014).

O pareamento das sequências *paired-end* foi realizado pela metodologia de *denoising* com auxílio do DADA2 (CALLAHAN et al., 2016), fornecido pelo QIIME 2 (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2*) (BOLYEN et al., 2019). Além do alinhamento das sequências, o DADA2 é responsável pela identificação de quimeras, filtragem de *singletons* e geração de *amplicon sequence variant* (AVS). Após a etapa de *denoising*, foi realizada uma nova filtragem para remoção de AVS raras, utilizando um ponto de corte para variantes com frequência mínima de 2%. A identificação taxonômica foi realizada a partir da base de dados do Greengenes versão 13.8 (DESANTIS et al., 2006), com classificadores disponibilizados pelo QIIME 2 para a região V3/V4 do gene rRNA 16S e a metodologia de classificação consenso do VSEARCH (ROGNES et al., 2016). PICRUST2 foi utilizado para predição das funções metagenômica baseadas na normalização das tabelas de AVSs (DOUGLAS et al., 2020).

5.2.3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software R versão 4.1.0 (R CORE TEAM, [s.d.]). Para avaliação das alterações na microbiota intestinal em relação a abundância total e a abundância relativa, levando em consideração os diferentes grupos experimentais, foi utilizado o pacote phyloseq (MCMURDIE; HOLMES, 2013).

Para as análises de alpha-diversidade, foram calculados os índices de espécies observadas, o índice de riqueza Chao1 e os índices de diversidade Shannon e Simpson, através do pacote phyloseq (MCMURDIE; HOLMES, 2013). Após o cálculo dos índices, análise de distribuição de frequências e o teste de Shapiro-Wilk foram aplicados para acessar a normalidade das amostras. Para amostras paramétricas foram aplicados os testes de *Student's t* ou ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey, de acordo com as variáveis analisadas. Já para amostras não paramétricas, foram empregados os testes de Mann-Whitney-Wilcoxon ou Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn.

A beta-diversidade também foi acessada utilizando o pacote phyloseq (MCMURDIE; HOLMES, 2013) e o pacote vegan (OKSANEN et al., 2019). Os dados de ordenação foram computados utilizando as metodologias de análise de coordenadas

principais (PCoA) e de escalonamento multidimensional não métrico (nMDS), ambas baseadas no índice de dissimilaridade de Bray-Curtis. Para determinar as diferenças estatísticas entre os grupos, foi realizado a análise de variância de permutação multivariada (teste de ADONIS com 10000 permutações) (ANDERSON; WALSH, 2013).

Para acessar as diferenças na abundância de táxons da microbiota intestinal entre os grupos experimentais, foi utilizado o pacote DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014), que realiza a análise diferencial baseada em um modelo de distribuição binominal negativa. A correlação entre as diferenças de táxons e os grupos experimentais foi determinada pela metodologia de análise linear discriminante (LDA) do tamanho do efeito (LEfSe) seguindo as condições: o valor de α para o teste fatorial de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney-Wilcoxon entre as classes foi de < 0.05 e o limiar de corte para o score logarítmico LDA para características discriminantes foi de > 2.0 (SEGATA et al., 2011). As predições das funções metabólicas foram analisadas através de LEfSe e do teste de Kruskal-Wallis com o valor de p ajustado pela taxa de falsas descobertas de Benjamini-Hochberg (FDR). Dados com valor de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

5.2.4 CITOMETRIA DE FLUXO DO CULTIVO DE ESPLÊNOCITOS

O baço dos animais em experimentação (CON, SXT, UND e UND+SXT) foi coletado assepticamente ao final do período de recuperação alimentar. Para o cultivo dos esplenócitos, o baço foi adicionado a uma placa de Petri com 5 mL de meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco, Thermo Fisher Scientific) com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific) e dissociados com auxílio de seringas até completo rompimento da estrutura do órgão. A suspensão foi filtrada e, logo após, centrifugada a 400 x g por 4 min. Uma etapa de lavagem com solução salina fosfatada (PBS) 1x e centrifugação a 400 x g por 4 min foi realizada. Para lise dos eritrócitos, foi adicionado 5 mL de tampão de lise cloreto de amônio-potássio (pH 7,2) e incubado por 5 min a temperatura ambiente. A reação foi parada com a adição de 10 mL de PBS 1x. As células foram centrifugadas a 400 x g por 4 min. O pellet foi suspenso em 1 mL de meio DMEM com 10% de FBS e o total de células foi determinado corando as células com azul de tripano 0,2% filtrado e utilizando a câmara de Neubauer. Para o cultivo, a concentração celular foi ajustada para 3×10^6 células por mL. As amostras foram aplicadas em triplicada

de 100 μL por poço em placas de 96 poços de cultivo celular LCP096 (Lavie) e incubadas por 72 h a 37 °C com 5% CO_2 em uma incubadora CO_2 Steri-Cycle modelo 371 (Thermo Fisher Scientific).

Após o período de incubação com os estímulos, os cultivos passaram por uma etapa de centrifugação a 400 x g por 4 min, uma etapa de lavagem com PBS 1x e outra etapa de centrifugação. Em seguida, foram adicionados os 50 μL de mix de anticorpos anti-marcadores extracelulares diluídos em tampão FACS (PBS 1x, BSA 3% e azida sódica 0,01%) por amostra e incubados por 30 min a 4 °C no escuro. Os painéis de anticorpos utilizados para imunofenotipagem estão descritos na Tabela 2. Foram adquiridos todos os eventos com o citômetro de fluxo BD FACSCanto™ (BD Biosciences) disponível no Laboratório de Imunologia da Célula B (LABI). Além disso, amostras de células com marcação única para cada anticorpo foram adquiridas com a finalidade de compensar a fluorescência da análise. Os dados obtidos foram analisados no software FlowJo versão 10.

Tabela 2. Descrição dos painéis de anticorpos utilizados para imunofenotipagem dos linfócitos isolados do baço dos camundongos ao final do experimento.

Marcadores	Fluoróforo
B220	APC-Cy7
CD3	FITC
Gr-1	FITC
CD23	PE-Cy7
GL7	PerCP-Cy5.5
CD38	APC
CD138	PE

F4/80	FITC
-------	------

5.2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises estatísticas não referentes ao sequenciamento da microbiota foram realizadas no software GraphPad Prism versão 7. A normalidade das amostras foi determinada pela análise de curtose e assimetria, além do teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para a comparação entre dois grupos com distribuição paramétrica foi utilizado o teste *t* bicaudal. Já para comparação entre dois grupos não-paramétricos foi utilizado o teste U de Mann-Whitney. O teste de análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguido do teste de comparação múltipla de Tukey foi utilizado para comparação entre grupos com distribuição paramétrica. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn foi realizado em comparações entre grupos não-paramétricos. Foram considerados estatisticamente significantes os dados que apresentavam valor de *p* menores que 0,05 ($p < 0,05$). Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Avaliação do peso de camundongos submetidos a protocolo de desnutrição energético-proteica durante a infância, de recuperação nutricional e de posterior acompanhamento a curto e a longo prazo.

Os camundongos C57BL/6 foram aleatoriamente distribuídos entre os grupos experimentais controle (CON) e desnutrido (UND) após o desmame, quando os camundongos apresentavam idade entre 3 e 4 semanas. Os animais alocados no grupo UND receberam dieta que consistia em apenas 60% do total consumido pelo grupo CON como modo de induzir a desnutrição proteica-energética. Os animais do grupo UND apresentaram redução significativa no peso (Figura 3). Os camundongos C57BL/6 machos do grupo UND iniciaram o experimento com pesos similares e, durante a desnutrição, divergiram nos dados, apresentando um peso significativamente reduzido ($p < 0,01$) a partir do dia 7 do experimento (Figura 7A). Essa tendência se manteve durante todo o período de desnutrição,

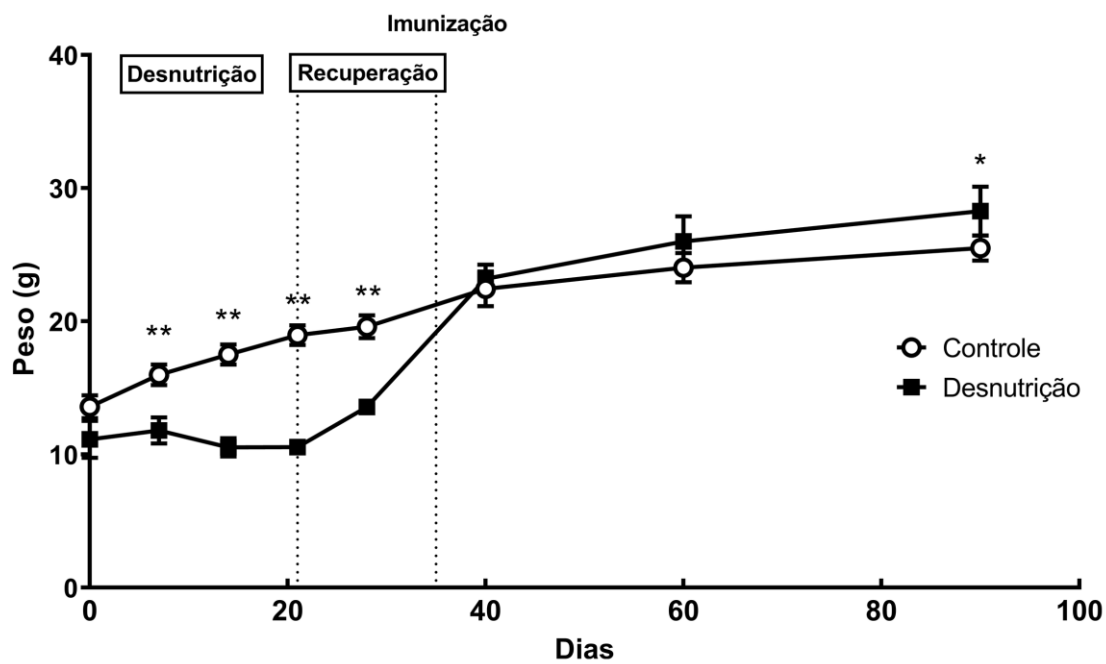
até o dia 21, no qual os animais dos grupos UND mantiveram o peso constante em torno de 10 g, enquanto os animais CON apresentavam um ganho de peso diário, chegando ao dia 21 do experimento com cerca de 18,9 g ($\pm 1,97$) contra 10,5 g ($\pm 0,48$) dos animais UND ($p < 0,01$). A recuperação com retomada gradual da administração de alimento foi marcada com o ganho de peso dos animais UND, porém os mesmos ainda apresentavam peso significativamente menor aos dos grupos CON ($p < 0,01$). Após o período de recuperação e a administração da vacina, ambos os grupos se igualaram em peso, demonstrando que a vacinação não influenciou no peso dos animais. Entretanto, no período final da experimentação, os animais UND demonstravam um peso significativamente maior que os animais CON, cerca de 28,28 g ($\pm 1,84$) dos grupos UND contra 25,5 g ($\pm 0,94$) dos CON ($p < 0,01$).

Já os camundongos C57BL/6 fêmeas também iniciaram o experimento com pesos similares e, durante a desnutrição, divergiram nos dados (Figura 7B). Durante a desnutrição, as fêmeas dos grupos UND apresentaram uma redução no peso, tendo iniciado o período de desnutrição, dia 0, com 13,27 g ($\pm 1,216$) e finalizado com 9,683 g ($\pm 0,95$), dia 21. Enquanto os animais CON apresentavam um ganho de peso diário, partindo de 13,03 g ($\pm 0,75$) e chegando ao dia 21 do experimento com 16,97 g ($\pm 0,35$). Durante os primeiros 21 dias de experimento, as fêmeas dos grupos UND apresentavam peso significativamente menor que as pertencentes aos grupos CON ($p < 0,01$). A recuperação também foi marcada com o ganho de peso dos animais UND, porém as fêmeas ainda apresentavam peso significativamente menor as dos grupos CON ($p < 0,01$). Após a recuperação e a administração da vacina, o peso dos animais se igualou e se manteve constante até o final do experimento.

Figura 7. A desnutrição durante a infância resulta em redução drástica de peso, que é revertida com a reposição alimentar.

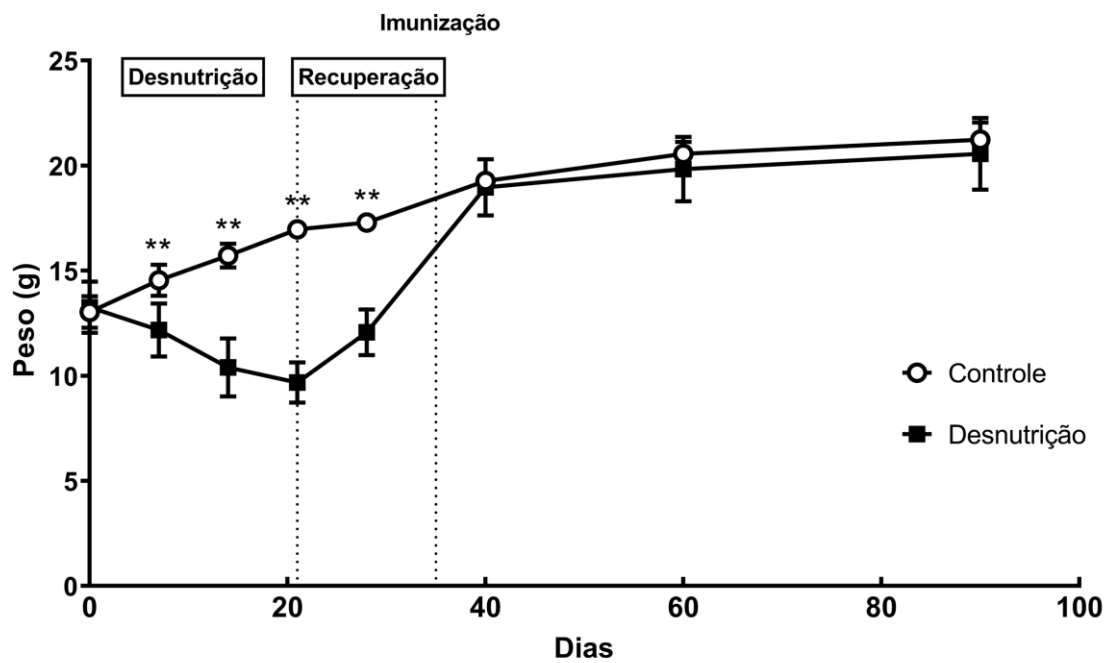
A

Machos



B

Fêmeas



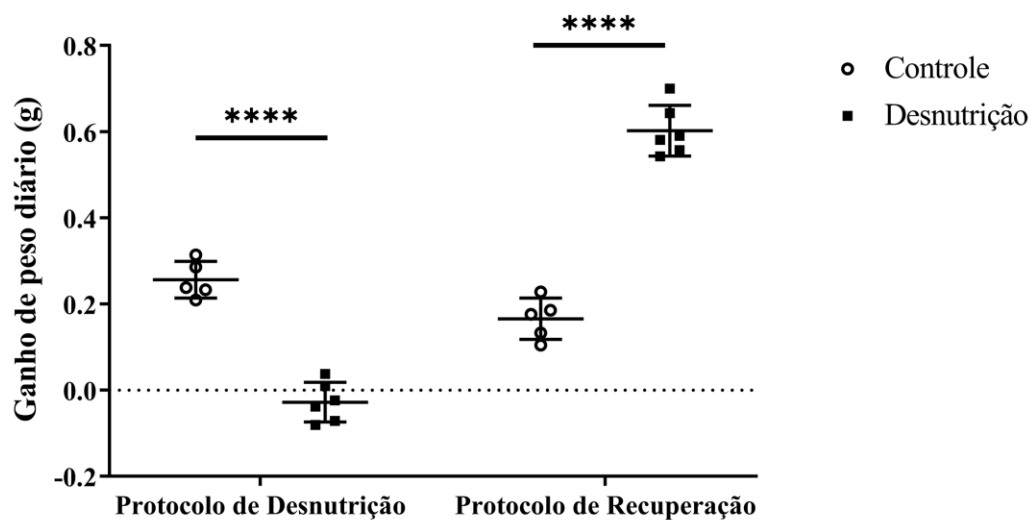
Legenda. Cinética do peso dos camundongos C57BL/6 em experimentação, demonstrando que a administração de uma dieta com redução proteica resulta em falha no ganho de peso de camundongos após o desmame, sendo revertida com a recuperação gradual da disponibilidade de alimento. Animais pertencentes aos grupos controles não-desnutridos estão representados pelos círculos em branco, já os animais pertencentes aos grupos que passaram pelo período de desnutrição estão representados pelos quadrados em preto. A) Cinética do peso dos camundongos C57BL/6 machos ($n = 11$), sendo $n = 5$ pertencentes aos grupos controles e $n = 6$ pertencentes aos grupos desnutridos. B) Cinética do peso dos camundongos C57BL/6 fêmeas ($n = 12$), sendo $n = 6$ pertencentes aos grupos controles e $n = 6$ pertencentes aos grupos desnutridos. A comparação entre os grupos controles e os grupos desnutridos por dia do experimento foi realizada pelo teste U de Mann-Whitney. Dados apresentados como média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Além da cinética de peso dos animais ao longo do experimento, o ganho de peso em gramas adquirido por dia durante o protocolo de desnutrição se mostrou significativamente reduzido em animais UND quando comparados com os animais CON (Figura 8). Os machos UND apresentaram um ganho de peso negativo $-0,027$ g ($\pm 0,046$) quando comparados com os machos CON $0,256$ g ($\pm 0,042$) ($p < 0,0001$) (Figura 8A). Com relação as fêmeas, os animais desnutridos também apresentaram um ganho de peso negativo $-0,17$ g ($\pm 0,033$) enquanto os animais CON apresentaram um ganho de $0,187$ g ($\pm 0,038$) ($p < 0,0001$) (Figura 8B). Entretanto, o ganho de peso em gramas adquirido por dia se mostrou significativamente elevado em camundongos dos grupos UND quando comparados aos grupos CON durante o período que compreende o protocolo de recuperação (Figura 8). Os animais machos UND apresentaram um ganho diário de $0,602$ g ($\pm 0,058$) comparados com um ganho de $0,165$ g ($\pm 0,048$) dos grupos CON ($p < 0,0001$) (Figura 8A). Já as fêmeas dos grupos UND apresentaram um ganho diário de $0,442$ g ($\pm 0,05$) comparados com um ganho de $0,109$ g ($\pm 0,01$) dos grupos CON ($p < 0,0001$) (Figura 8B).

Figura 8. Animais que foram submetidos à desnutrição infantil apresentam um maior ganho de peso por dia após a reintrodução alimentar.

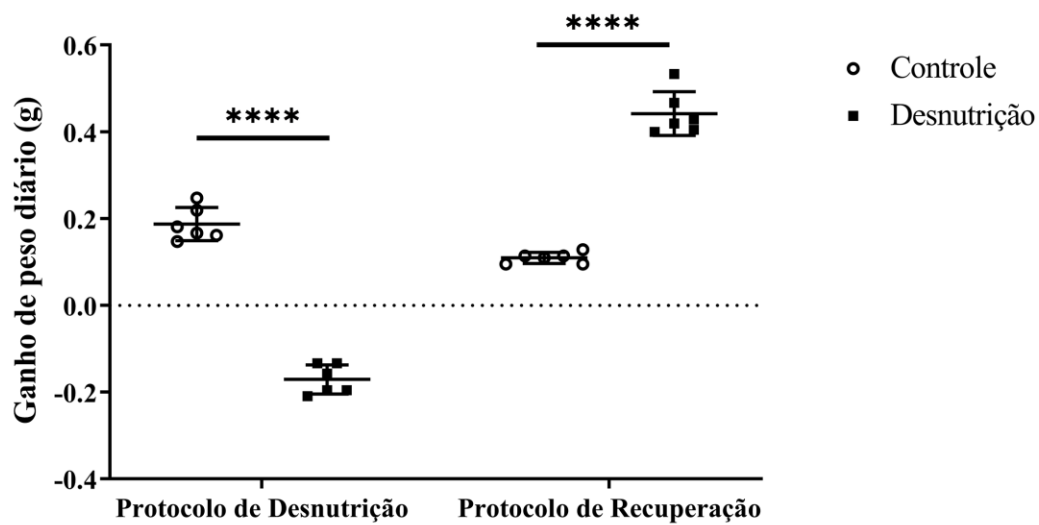
A

Machos



B

Fêmeas



Legenda. Ganho de peso em gramas por dia dos camundongos C57BL/6 em experimentação durante o período que compreende o protocolo de desnutrição e o protocolo de recuperação. Os círculos brancos representam os animais pertencentes aos grupos controles e quadrados pretos representam os animais dos grupos desnutridos e recuperados. O total de camundongos C57BL/6 machos avaliados foi 11 ($n = 11$), sendo $n = 5$ pertencentes aos grupos controles e $n = 6$ pertencentes aos grupos desnutridos e recuperados. O total de camundongos C57BL/6 fêmeas avaliadas foi 12 ($n = 12$), sendo $n = 6$ pertencentes aos grupos controles e $n = 6$ pertencentes aos grupos desnutridos. A comparação entre os grupos controles e os grupos desnutridos por gênero foi realizada pelo teste U de Mann-Whitney. Dados apresentados como média \pm desvio padrão. **** $p < 0,0001$.

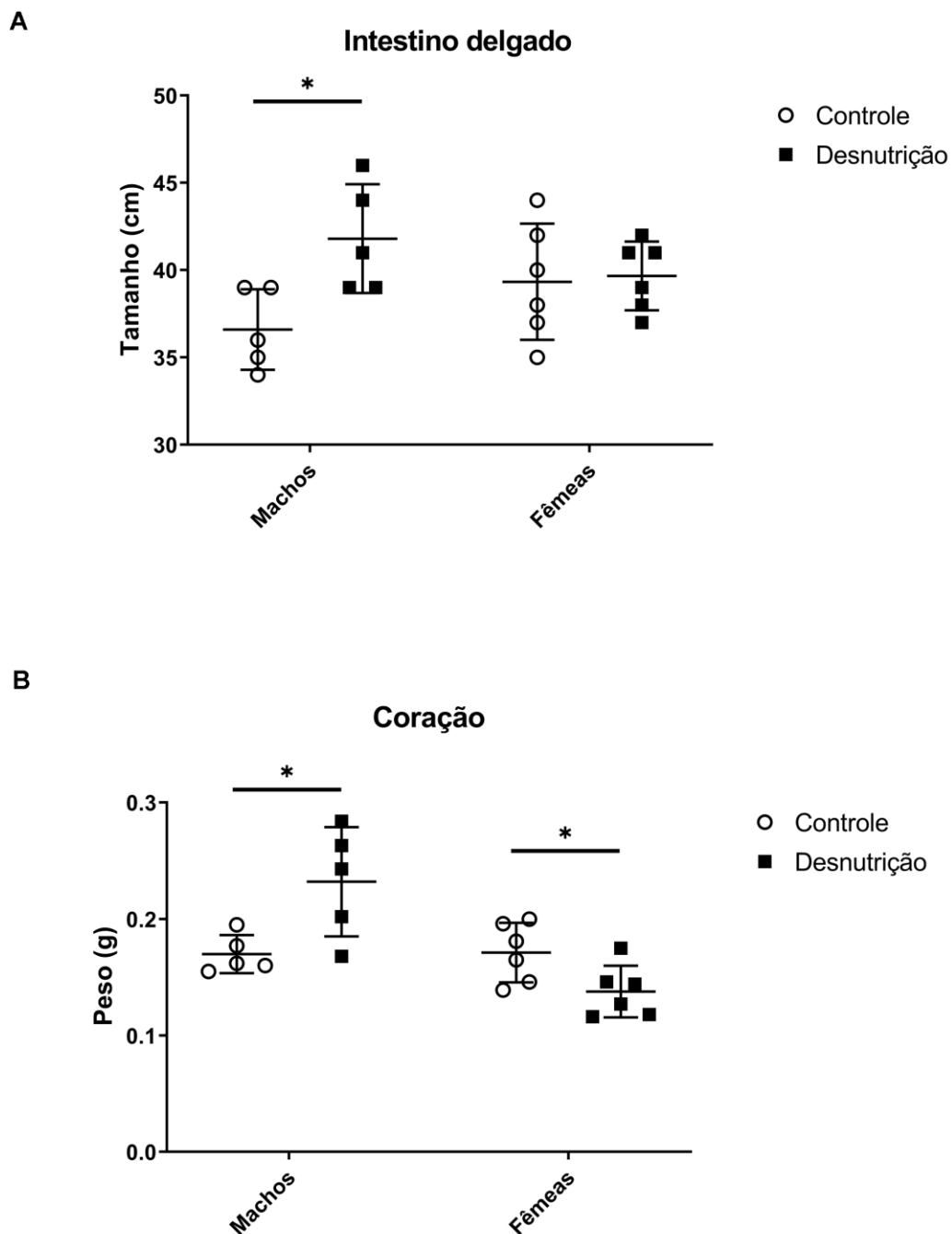
5.3.2 Alterações no tamanho de órgãos de camundongos C57BL/6 adultos, submetidos a desnutrição durante a infância.

Para determinar o efeito da desnutrição no crescimento e na fisiologia dos órgãos de camundongos C57BL/6, os animais tiveram suas medidas avaliadas levando em consideração o comprimento do corpo e os tamanhos de cauda, de intestino grosso, de intestino delgado e de fêmur, além do peso do coração, do fígado e dos rins.

As alterações foram observadas principalmente nos camundongos machos, os quais apresentaram diferenças no tamanho do intestino delgado e no peso do coração (Figura 9). Os animais machos C57BL/6 UND apresentaram um aumento no tamanho médio do intestino delgado ($41,8 \text{ cm} \pm 3,114$) em relação aos grupos CON ($36,6 \text{ cm} \pm 2,302$) ($p < 0,05$) (Figura 9A). Esse aumento não foi observado nas fêmeas (Figura 9A). O coração foi outro órgão que apresentou alterações em relação ao peso (Figura 9B). Entretanto, seus dados não se mostraram congruentes entre os gêneros. Enquanto os machos C57BL/6 UND apresentaram um aumento no peso médio do coração ($0,232 \text{ g} \pm 0,046$) em relação aos animais CON ($0,1698 \text{ g} \pm 0,01698$) ($p < 0,05$), as fêmeas C57BL/6 UND mostraram uma redução no peso médio do coração ($0,1377 \text{ g} \pm 0,0222$) em relação aos CON ($0,1712 \text{ g} \pm 0,0255$) ($p < 0,05$). As outras medidas analisadas como o

comprimento do corpo e os tamanhos de cauda, de intestino grosso e de fêmur, além do peso do fígado e dos rins, estão detalhadas na Tabela 3.

Figura 9. Desnutrição durante a infância resultou em alterações no tamanho do intestino delgado e no peso do coração.



Fonte: Eslabão (2021)

Legenda. Determinação do efeito da desnutrição proteico-energética no tamanho em centímetros do intestino delgado (A) e no peso em gramas do coração (B) de camundongos C57BL/6. Os círculos brancos representam os animais pertencentes aos grupos controles e os quadrados pretos representam os animais dos grupos desnutrição. O total de

camundongos C57BL/6 machos avaliados foi 10 ($n = 10$), sendo $n = 5$ pertencentes aos grupos controles e $n = 5$ pertencentes aos grupos desnutrição. O total de camundongos C57BL/6 fêmeas avaliadas foi 12 ($n = 12$), sendo $n = 6$ pertencentes aos grupos controles e $n = 6$ pertencentes aos grupos desnutridos. A comparação entre os grupos controles e os grupos desnutridos por gênero foi realizada pelo teste U de Mann-Whitney. Dados apresentados como média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$.

Tabela 3. Descrição das medidas analisadas como o comprimento do corpo e os tamanhos de cauda, de intestino grosso e de fêmur, além do peso do fígado e dos rins, em camundongos C57BL/6.

	Machos			Fêmeas		
	Controle	Desnutrição	<i>P</i>	Controle	Desnutrição	<i>P</i>
Corpo (cm)	8,74 ($\pm 0,1673$)	9,25 ($\pm 0,3697$)	0,087	8,65 ($\pm 0,2429$)	8,467 ($\pm 0,2338$)	0,292
Cauda (cm)	8,68 ($\pm 0,1304$)	8,84 ($\pm 0,1517$)	0,095	8,417 ($\pm 0,2927$)	8,033 ($\pm 0,3327$)	0,056
Fêmur (cm)	1,6 ($\pm 0,1155$)	1,74 ($\pm 0,05477$)	0,158	1,7 (± 0)	1,7 (± 0)	>0,999
Intestino Grosso (cm)	6,22 ($\pm 0,6723$)	7,16 ($\pm 1,199$)	0,341	7,25 ($\pm 0,6892$)	7,367 ($\pm 1,108$)	>0,999

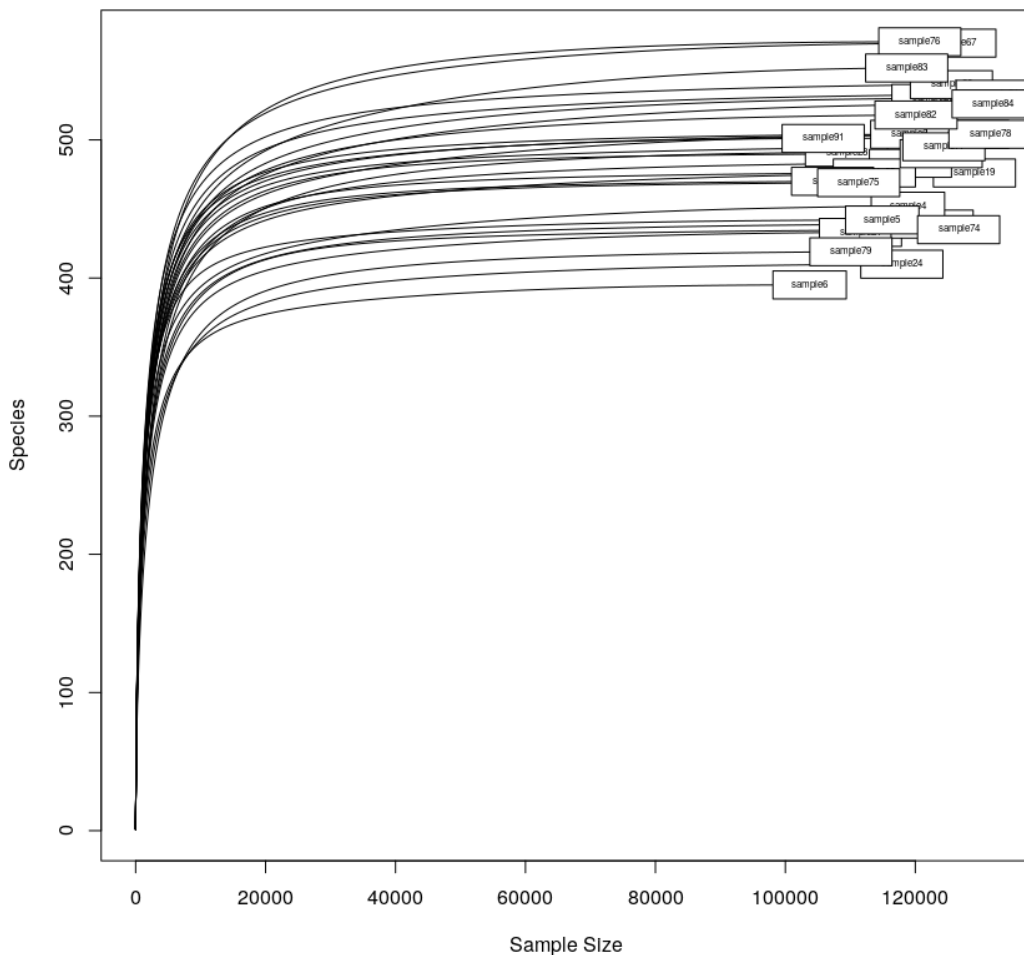
Rim (g)	0,2446 (\pm 0,01885)	0,2458 (\pm 0,03125)	0,888	0,1765 (\pm 0,01783)	0,1658 (\pm 0,02994)	0,588
Fígado (g)	1,558 (\pm 0,1183)	1,893 (\pm 0,2696)	0,095	1,253 (\pm 0,1781)	1,243 (\pm 0,1857)	>0,999

Legenda. Para dados paramétricos (intestino grosso e rim) foram aplicados teste *t* bicaudal; para dados não-paramétricos (corpo, cauda, fêmur e fígado) foram aplicados teste U de Mann-Whitney; dados apresentados como média \pm desvio padrão.

5.3.3 Desnutrição durante a infância resulta alterações em famílias e gêneros específicos na composição da microbiota intestinal de camundongos C57BL/6.

A avaliação da composição da microbiota intestinal foi realizada através do sequenciamento por síntese do RNA ribossomal 16S, utilizando a plataforma Illumina HiSeq 2500 (Illumina, Inc.), de DNA extraído de amostras de fezes de camundongos C57BL/6. O sequenciamento gerou aproximadamente 3.3 milhões de leituras (*reads*), com uma média de 119.571 leituras por amostra. As sequências foram classificadas em AVS, resultando em uma média de 504.000 AVSs por amostra. A análise da cobertura em relação a riqueza de espécies identificadas no sequenciamento foi realizada através da construção de uma curva de rarefação, demonstrando que todas as amostras atingiram o platô antes do número máximo de sequências geradas para cada amostra assegurando que a reação de sequenciamento foi capaz de identificar todas as espécies presentes em cada amostra e que não houve discrepâncias nos dados obtidos a partir das amostras (Figura 10).

Figura 10. Curva de rarefação do sequenciamento



Fonte: Eslabão (2021)

Legenda. Curva de rarefação de todas as amostras do sequenciamento. Número de espécies identificadas pelo número de seqüências. Cada linha do gráfico corresponde a curva de rarefação de uma amostra sequenciada. O retângulo no final de cada linha corresponde a nomenclatura designada para cada amostra.

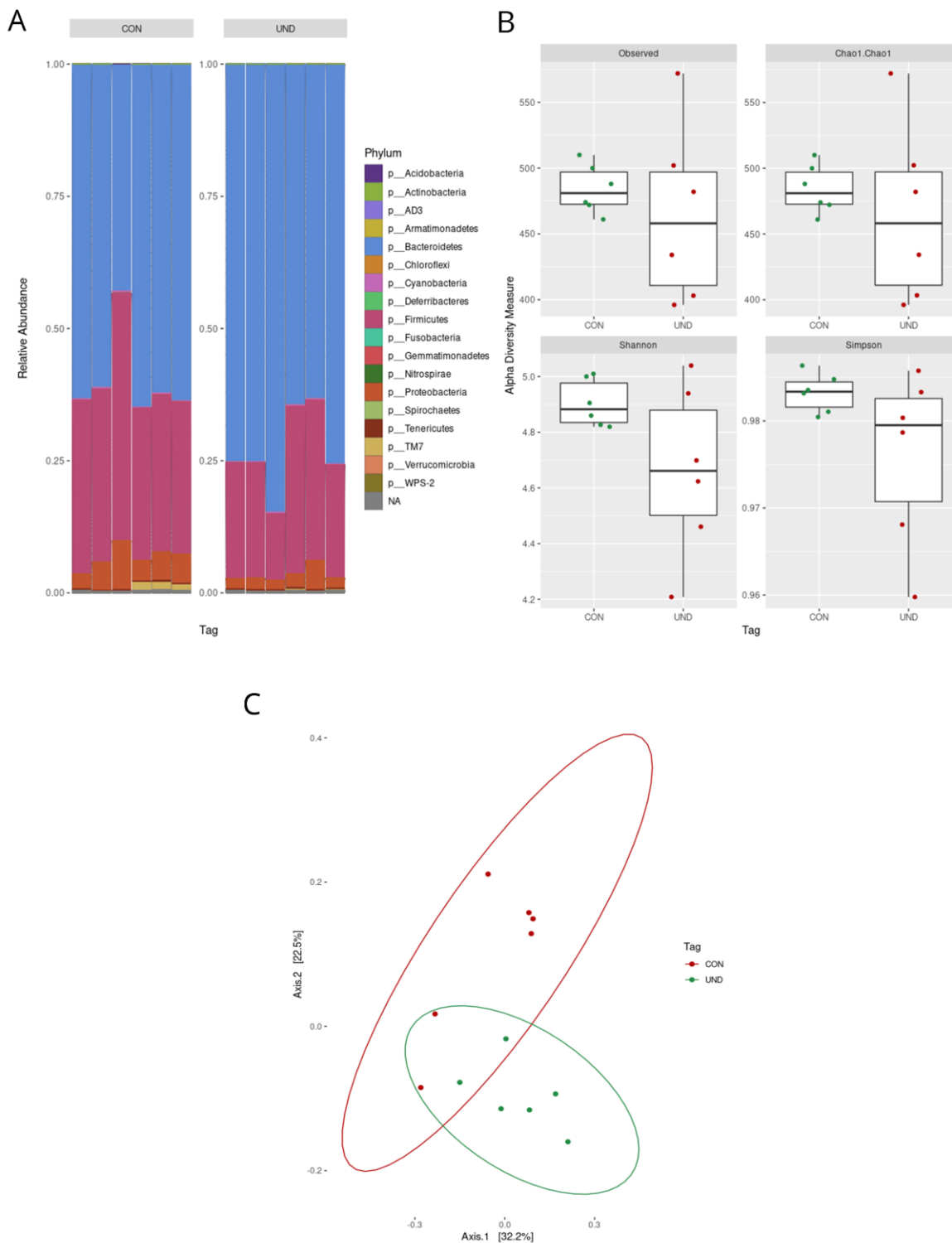
A identificação taxonômica das AVSs geradas foi realizada através do alinhamento com o banco de dados Greengenes versão 13.8 (DESANTIS et al., 2006). Caracterizou-se a composição e funcionalidade da microbiota intestinal de camundongos C57BL/6 no período referente ao final do protocolo de desnutrição e recuperação alimentar (Figuras 11 e 12).

A avaliação do perfil da microbiota intestinal se deu, primeiramente, pela análise da abundância relativa dos principais filos presentes na amostra (Figura 11A). Observa-se uma redução significativa na abundância relativa de Proteobacteria ($0,053 \pm 0,02$ CON vs. $0,027 \pm 0,01$ UND, $p < 0,05$) e um aumento significativo de Bacteroidetes ($0,59 \pm 0,08$ CON vs. $0,73 \pm 0,08$ UND, $p < 0,05$) e Verrucomicrobia (0 ± 0 CON vs. $0,00011 \pm 0,00008$ UND, $p < 0,05$) nos animais UND. Além disso, para comparação de riqueza, número de espécies presentes nas amostras, foram utilizados os índices *Observed* (número de OTUs presentes na amostra) e Chao1 (estimativa do possível número de OTUs presentes na amostra com base na avaliação de OTUs raras) (Figura 11B). Já para comparações da diversidade apresentada pela microbiota nos diferentes tempos experimentais foram utilizados dois índices distintos: Shannon, índice que assume que todas as espécies estão representadas em uma determinada amostra, resultando em um maior peso estatístico para a riqueza da amostra; e Simpson, índice que assume maior peso estatístico para a uniformidade da amostra e para as espécies mais comuns e/ou dominantes, o que resulta na não influência de espécies raras na diversidade da amostra (Figura 11B). Não foram observadas diferenças para os índices *Observed* (481 CON vs. 458 UND), Chao1 (481 CON vs. 458 UND), Shannon (4,88 CON vs. 4,66 UND) e Simpson (0,983 CON vs. 0,98 UND) analisados. Entretanto, todos os índices sugerem uma maior variação intragrupo nos animais do grupo UND comparados aos animais do grupo CON.

Para acessar a diferença que cada amostra apresenta em relação as demais amostras levando em consideração os grupos CON e UND, foram realizadas análises de beta diversidade tendo como base o índice de diversidade de Bray-Curtis, que emprega a abundância das OTUs em sua métrica, e representados através de gráficos de análises de coordenadas principais (PCoA) (Figura 11C). A análise de adonis (análise de variância por permutação usando distância de matrizes) foi utilizada para identificar se os animais CON e UND apresentavam diferenças na posição dos seus centroides. O resultado demonstrou que os grupos apresentam diferentes localizações de centroides (p ajustado < 0.0303). A análise de PCoA demonstra que as amostras grupo UND tendem a se distanciar do grupo CON. Além disso, a análise de dispersão beta comprovou que não existem diferenças significativas na dispersão das amostras quando os grupos são comparados, ou seja, ambos

os grupos possuem variações similares da dispersão de suas amostras em relação aos centroides.

Figura 11. A microbiota de camundongos C57BL/6 UND não apresenta o mesmo perfil da microbiota de camundongos C57BL/6 CON após o final do período de recuperação alimentar.



Fonte: Eslobão (2021)

Legenda. Riqueza e diversidade de amostras de fezes de camundongos C57BL/6 CON (n=6) e UND (n=6) ao final do protocolo de recuperação. A) Análise da abundância relativa

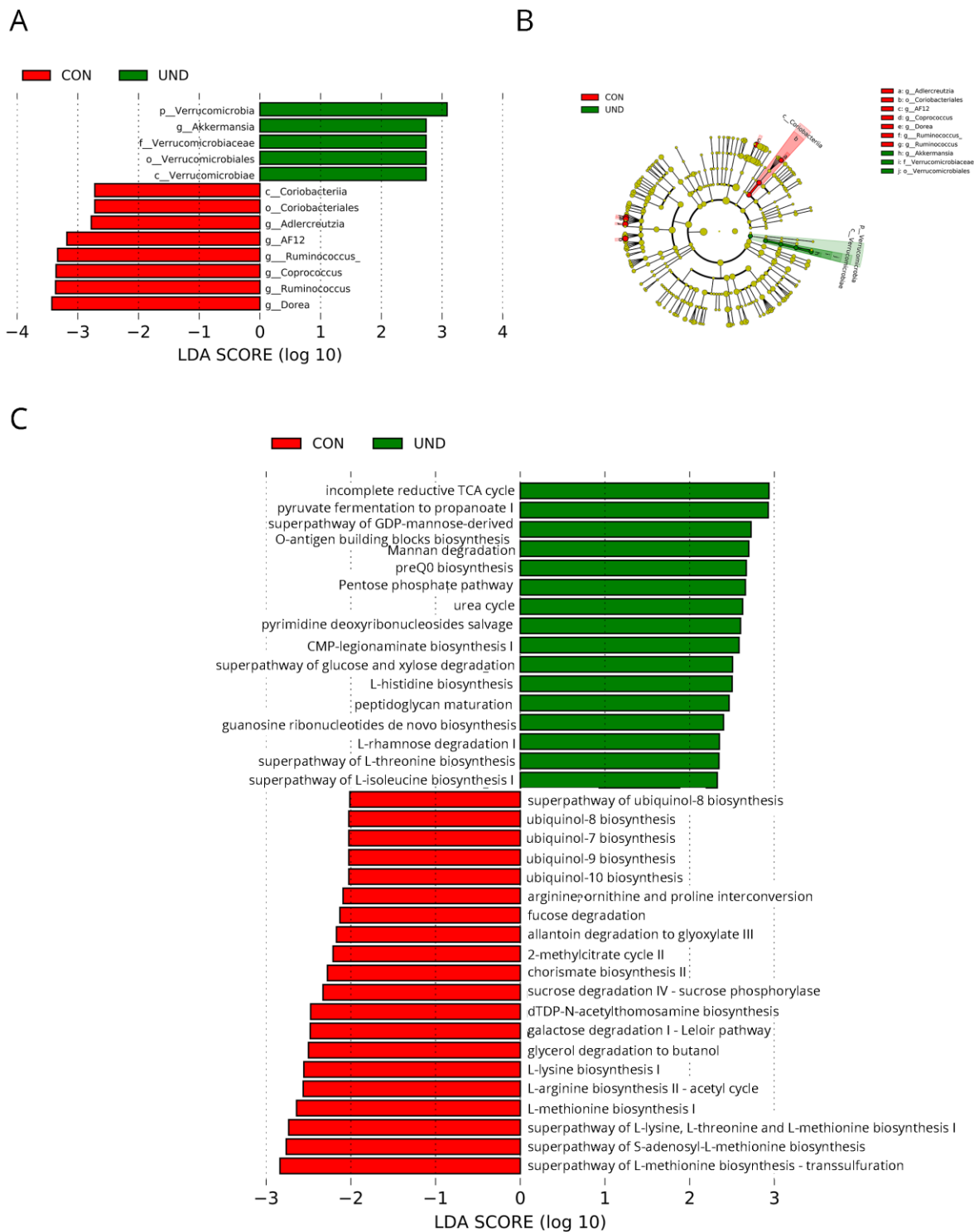
dos filos presentes nas amostras. B) Diagrama de caixa representando medidas de diversidade alfa (índices: *Observed*, Chao1, Shannon, Simpson) nos grupos CON (verde) e UND (vermelho). C) Análise de coordenadas principais dos índices de diversidade de Bray-Curtis para os grupos CON (vermelho) e UND (verde). A comparação dos animais CON e UND foi realizada por teste *t* para dados paramétricos e teste U de Mann-Whitney para dados não-paramétricos.

A identificação das taxa que demonstraram diferenças significativas entre os grupos CON e UND foi realizada pela análise discriminante linear (LDA) com base no efeito do tamanho (LEfSe), o qual consiste em um algoritmo para identificação de biomarcadores levando em consideração as características genômicas (genes, vias metabólicas e/ou taxa) e condições biológicas (SEGATA et al., 2011) (Figura 12A). O algoritmo LEfSe utiliza o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para primeiramente detectar diferenças nas abundâncias dos táxons, seguido do teste U de Mann-Whitney para identificar as significâncias biológicas das condições delimitadas. Os camundongos UND apresentaram alterações significativas em 13 taxa comparadas com o grupo CON ($p < 0,05$). Quando comparados ao grupo CON, observa-se que os animais UND apresentam um aumento do significativo do filo Verrucomicrobia e, conseqüentemente, da família Verrucumicrobiales e do gênero *Akkermansia* (0 ± 0 CON vs. $0,00011 \pm 0,00007$ UND). Já o grupo CON apresenta aumento significativo nos gêneros *Dorea* ($0,004 \pm 0,005$ CON vs. $0,0005 \pm 0,0003$ UND), *Ruminococcus* família Lachnospiraceae ($0,006 \pm 0,001$ CON vs. $0,0038 \pm 0,001$ UND), *Coprococcus*, *Ruminococcus* família Ruminococcaceae ($0,007$ CON $\pm 0,001$ vs. $0,0047 \pm 0,001$ UND), *AF12* ($0,003 \pm 0,001$ CON vs. $0,0008 \pm 0,0003$ UND) e *Adlercreutzia* ($0,0004 \pm 0,0001$ CON vs. $0,0002 \pm 0,0001$ UND) em relação ao grupo UND. A Figura 12B mostra a representação em cladograma das alterações observadas na microbiota intestinal pela técnica de LEfSe.

A análise da funcionalidade da microbiota por LEfSe demonstrou um alterações em 36 vias metabólicas (Figura 12C), sendo que o grupo CON teve maior presença principalmente em vias metabólicas relacionadas com a degradação de açúcares [*sucrose degradation* IV ($0,0063 \pm 0,002$ CON vs. $0,0033 \pm 0,002$ UND); *fucose degradation* ($0,008 \pm 0,0009$ CON vs. $0,006 \pm 0,001$ UND)] e biossíntese de amino ácidos [*arginine*, *ornithine*

and proline interconversion ($0,006 \pm 0,001$ CON vs. $0,004 \pm 0,0007$ UND); *L-methionine biosynthesis I* ($0,015 \pm 0,004$ CON vs. $0,008 \pm 0,003$ UND); *superpathway of L-methionine biosynthesis* ($0,027 \pm 0,007$ CON vs. $0,017 \pm 0,006$ UND); *superpathway of S-adenosyl-L-methionine biosynthesis* ($0,027 \pm 0,007$ CON vs. $0,012 \pm 0,005$ UND)]. Entretanto, em camundongos UND observa-se uma maior presença sobretudo das vias metabólicas responsáveis pelo metabolismo de componentes inorgânicos [*urea cycle* ($0,015 \pm 0,003$ CON vs. $0,021 \pm 0,004$ UND)], pela degradação de açúcares [*L-rhamnose degradation I* ($0,017 \pm 0,0015$ CON vs. $0,02 \pm 0,002$ UND)], pela biossíntese de vitaminas [*preQ0 biosynthesis* ($0,031 \pm 0,004$ CON vs. $0,037 \pm 0,004$ UND)], pela biossíntese de parede celular [*peptidoglycan maturation* ($0,034 \pm 0,002$ CON vs. $0,038 \pm 0,003$ UND)], pela geração de metabolitos e energia [*pentose phosphate pathway* ($0,034 \pm 0,003$ CON vs. $0,041 \pm 0,004$ UND)] e pela biossíntese de açúcar nucleotídeo [*O-antigen building blocks biosynthesis* ($0,044 \pm 0,004$ CON vs. $0,05 \pm 0,005$ UND)].

Figura 12. Camundongos C57BL/6 UND apresentam alterações na composição e funcionalidade da microbiota intestinal mesmo após recuperação alimentar.



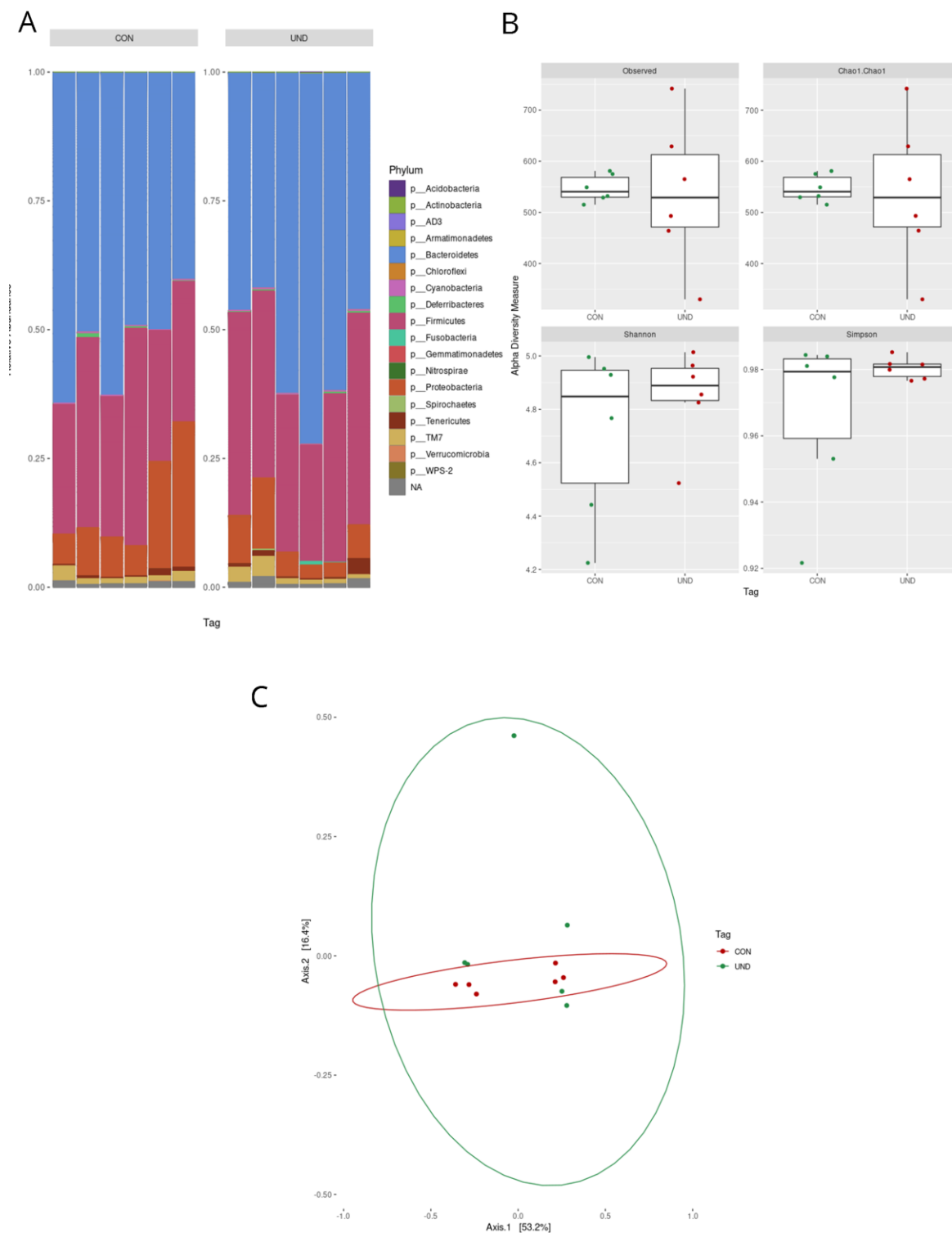
Fonte: Esalvão (2021)

Legenda. Clados taxonômicos e vias metabólicas alterados significativamente em amostras de fezes de camundongos C57BL/6 CON (n=6) e UND (n=6) ao final do protocolo de

recuperação alimentar. A) Análise discriminante linear (LDA) com base no tamanho do efeito (LEfSe) para composição da microbiota de camundongos C57BL/6 CON (n=6) e UND (n=6). B) Cladograma da análise discriminante linear (LDA) com base no tamanho do efeito (LEfSe) para composição da microbiota de camundongos C57BL/6 CON (n=6) e UND (n=6). C) Análise discriminante linear (LDA) com base no tamanho do efeito (LEfSe) para funcionalidade metabólica da microbiota de camundongos C57BL/6 CON (n=6) e UND (n=6). Dados apresentados em score LDA (log10) dos táxons aumentados significativamente ($p < 0,05$). O algoritmo LEfSe utiliza o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para detectar diferenças nas abundâncias dos táxons, seguido do teste U de Mann-Whitney para identificar as significâncias biológicas das condições delimitadas.

Ao final do período experimental, cerca 20 semanas após o final do protocolo de recuperação, a composição da microbiota intestinal foi analisada novamente para os grupos de camundongos C57BL/6 CON e UND. Observa-se uma tendência a maior abundância relativa do filo Proteobacteria ($0,13 \pm 0,09$ CON vs. $0,07 \pm 0,04$ UND) em camundongos CON quando comparados com os camundongos UND (Figura 13A). Além disso, foi possível notar que o grupo UND apresentou uma maior abundância relativa do filo Tenericutes ($0,0057 \pm 0,04$ CON vs. $0,0085 \pm 0,011$ UND) quando comparado com o grupo CON. Com relação a alpha diversidade (Figura 13B), não foram observadas diferenças para os índices *Observed* (540 vs. 529, CON e UND respectivamente), Chao1 (541 vs. 529, CON e UND respectivamente), Shannon (4,85 vs. 4,89, CON e UND respectivamente) e Simpson (0,979 vs. 0,981, CON e UND respectivamente). Podemos notar que o grupo UND possui tendência de redução nos índices de riqueza (*Observed* e Chao1) e de aumento nos índices de diversidade (Shannon e Simpson). Já a análise de PCoA demonstra que os centroides dos grupos analisados se localizam nas mesmas coordenadas (Figura 13C). Além disso, a análise de dispersão beta comprovou que não existem diferenças significativas na dispersão das amostras quando os grupos são comparados.

Figura 13. Os efeitos da desnutrição durante a infância na alpha e beta diversidade da microbiota intestinal são amenizados a longo prazo.



Fonte: Eslabão (2021)

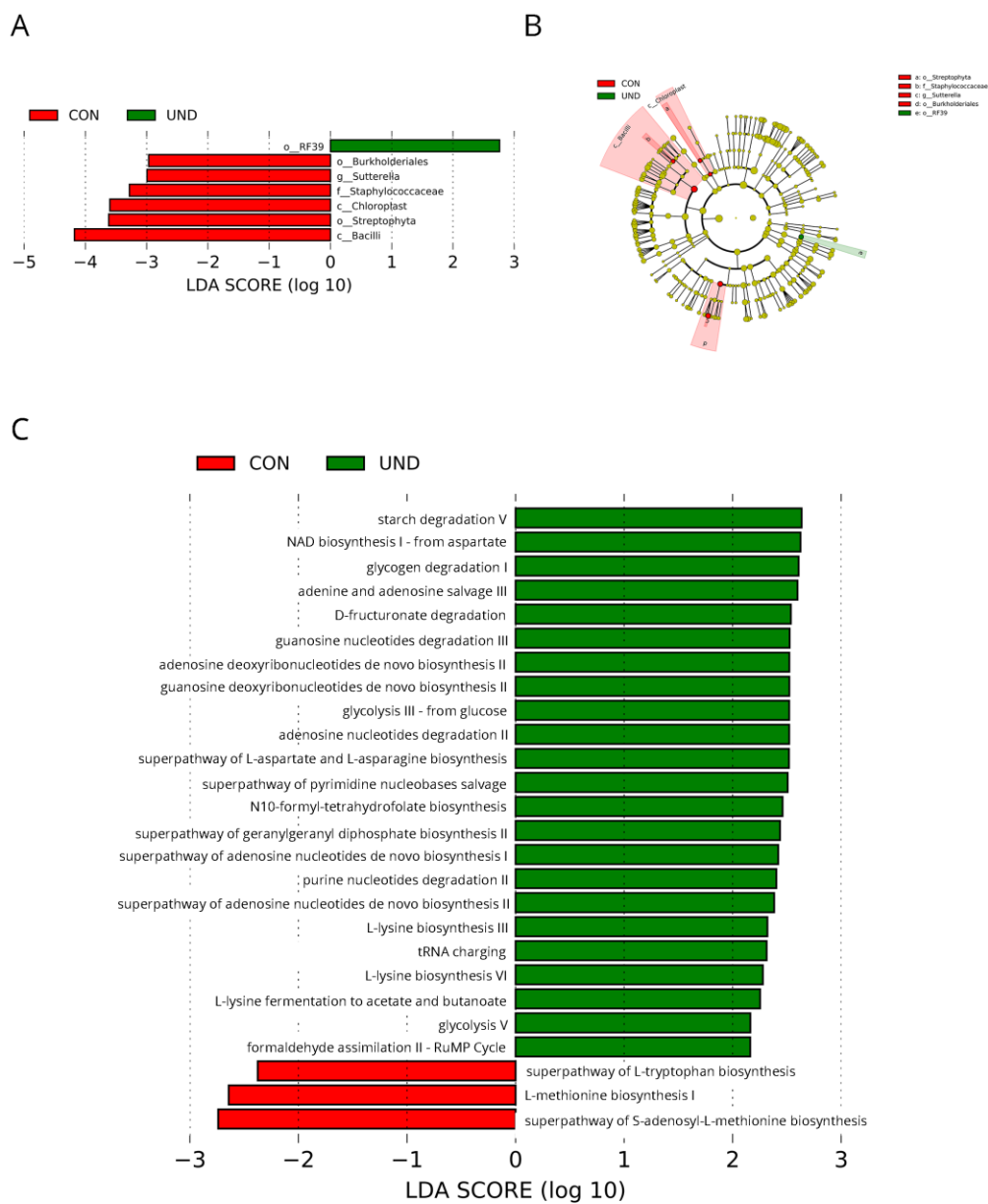
Legenda. Riqueza e diversidade de amostras de fezes de camundongos C57BL/6 CON (n=6) e UND (n=6) ao final do período experimental. A) Análise da abundância relativa dos filos presentes nas amostras. B) Diagrama de caixa representando medidas de diversidade alfa (índices: *Observed*, Chao1, Shannon, Simpson) nos grupos CON (verde) e UND (vermelho). C) Análise de coordenadas principais dos índices de diversidade de Bray-Curtis para os grupos CON (vermelho) e UND (verde). A comparação dos animais CON e UND foi realizada por teste *t* para dados paramétricos e teste U de Mann-Whitney para dados não-paramétricos.

A análise de LEfSe para identificação de taxa significativas demonstrou diferenças de 7 taxa quando levado em consideração os grupos CON e UND no período aproximadamente 20 semanas após o final do protocolo de recuperação (Figura 14A). O grupo CON apresentou um aumento significativo na família Staphylococcaceae ($0,0001 \pm 0,0001$ CON vs. 0 ± 0 UND) e do gênero *Sutterella* ($0,0017 \pm 0,0008$ CON vs. $0,0006 \pm 0,0003$ UND), enquanto o grupo UND demonstrou aumento significativo da ordem RF39 (filo Tenericutes) ($0,00002 \pm 0,00003$ CON vs. $0,00004 \pm 0,0006$ UND). A Figura 14B mostra a representação em cladograma das alterações observadas na microbiota intestinal pela técnica de LEfSe.

A análise da funcionalidade da microbiota por LEfSe demonstrou alterações em 25 vias metabólicas distribuídas entre os grupos CON e UND (Figura 14C). O grupo CON apresentou alterações em vias metabólicas relacionadas com biossíntese de aminoácidos [*superpathway of L-tryptophan biosynthesis* ($0,003 \pm 0,002$ CON vs. $0,0001 \pm 0,0001$ UND), *L-methionine biosynthesis I* ($0,021 \pm 0,007$ CON vs. $0,012 \pm 0,004$ UND), *S-adenosyl L-methionine biosynthesis* ($0,03 \pm 0,008$ CON vs. $0,017 \pm 0,005$ UND)]. Já o grupo UND apresentou alteração principalmente nas vias de degradação de nucleotídeos [*purine nucleotides degradation II* ($0,022 \pm 0,001$ CON vs. $0,024 \pm 0,0009$ UND), *guanosine nucleotides degradation III* ($0,025 \pm 0,001$ CON vs. $0,028 \pm 0,002$ UND)], de degradação de polissacarídeos [*starch degradation V* ($0,05 \pm 0,003$ CON vs. $0,053 \pm 0,001$ UND), *glycogen degradation I* ($0,051 \pm 0,003$ CON vs. $0,054 \pm 0,001$ UND)], da biossíntese de folato [*N10-formyl-tetrahydrofolate biosynthesis* ($0,045 \pm 0,002$ CON vs. $0,047 \pm 0,001$ UND)], da fermentação de SCFA [*L-lysine fermentation to acetate and*

butanoate ($0,003 \pm 0,0007$ CON vs. $0,004 \pm 0,001$ UND)], de utilização e assimilação de C1 [*formaldehyde assimilation II - RuMP Cycle* ($0,0058 \pm 0,001$ CON vs. $0,0074 \pm 0,001$ UND)], de biossíntese de nucleotídeos [*guanosine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis II* ($0,056 \pm 0,001$ CON vs. $0,056 \pm 0,002$ UND), *adenosine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis II* ($0,056 \pm 0,001$ CON vs. $0,056 \pm 0,002$ UND), *superpathway of pyrimidine nucleobases salvage* ($0,06 \pm 0,0005$ CON vs. $0,061 \pm 0,002$ UND)] e de aminoácido biossíntese [*L-lysine biosynthesis VI* ($0,058 \pm 0,001$ CON vs. $0,06 \pm 0,002$ UND), *L-lysine biosynthesis III* ($0,059 \pm 0,001$ CON vs. $0,061 \pm 0,002$ UND)].

Figura 14. Os efeitos da desnutrição na composição e funcionalidade da microbiota ainda são marcantes mesmo 20 semanas após o final do protocolo de recuperação.



Fonte: Eslabão (2021)

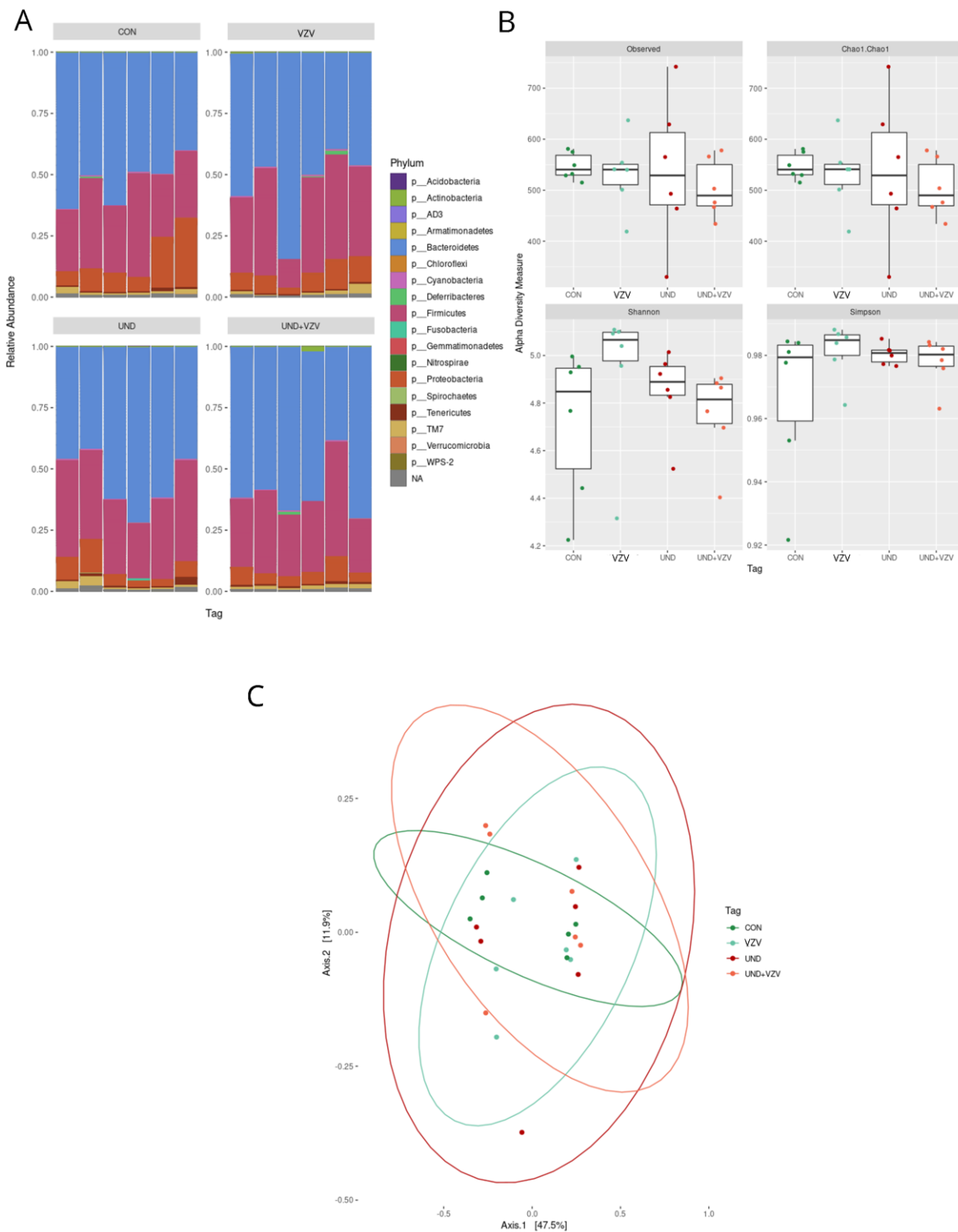
Legenda. Clados taxonômicos e vias metabólicas alterados significativamente em amostras de fezes de camundongos C57BL/6 CON (n=6) e UND (n=6) ao final do experimento. A) Análise discriminante linear (LDA) com base no tamanho do efeito (LEfSe) para composição da microbiota de camundongos C57BL/6 CON (n=6) e UND (n=6). B) Cladograma da análise discriminante linear (LDA) com base no tamanho do efeito (LEfSe) para composição da microbiota de camundongos C57BL/6 CON (n=6) e UND (n=6). C) Análise discriminante linear (LDA) com base no tamanho do efeito (LEfSe) para funcionalidade metabólica da microbiota de camundongos C57BL/6 CON (n=6) e UND (n=6). Dados apresentados em score LDA (log10) dos táxons aumentados significativamente ($p < 0,05$). O algoritmo LEfSe utiliza o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para detectar diferenças nas abundâncias dos táxons, seguido do teste U de Mann-Whitney para identificar as significâncias biológicas das condições delimitadas.

5.3.4 Avaliação funcional em camundongos adultos dos efeitos decorrentes da desnutrição energético-proteica durante a infância.

Os resultados até aqui obtidos mostraram que existe alteração da microbiota intestinal tanto em composição quanto na sua funcionalidade metabólica presente em animais adultos que sofreram desnutrição na infância. Considerando isso, foi levantada a possibilidade de testar se esses efeitos poderiam ter efeito prático na resposta dos animais a estímulos diversos. Assim, como forma de testar essa possibilidade, animais que passaram pelo mesmo protocolo de indução de desnutrição e recuperação alimentar, foram então imunizados com a vacina anti-varicela-zoster. Dessa forma, após o final do período de recuperação alimentar, foi realizada a inoculação da vacina comercial do vírus da varicela-zoster cepa Oka vivo atenuado, Varilrix® (GlaxoSmithKline). Ao final do período experimental, cerca de 20 semanas após o protocolo de recuperação, a composição da microbiota intestinal dos quatro grupos de camundongos C57BL/6 (CON, VZV, UND e UND+VZV) foi analisada. Observa-se uma maior abundância relativa do filo Proteobacteria em camundongos CON quando comparados com os demais grupos (Figura 15A). Além disso, podemos notar que a razão entre Bacteroidetes e Firmicutes se mantém relativamente similar entre os grupos, sendo que a única grande alteração na razão é observada em apenas um animal do grupo VZV. O grupo UND apresenta uma maior

abundância relativa do filo Tenericutes quando comparado com os demais grupos. Com relação a alpha diversidade (Figura 15B), não foram observadas diferenças para os índices *Observed*, Chao1, Shannon e Simpson. Já a análise de PCoA demonstra que os centroides de todos os grupos analisados se localizam nas mesmas coordenadas (Figura 15C). A análise de dispersão beta comprovou que não existem diferenças significativas na dispersão das amostras quando todos os grupos são comparados.

Figura 15. O perfil da microbiota intestinal de camundongos desnutridos e vacinados (UND e UND+VZV) apresenta características similares aos grupos controles (CON e VZV) após 20 semanas de reestabelecimento alimentar.



Fonte: Esalvão (2021)

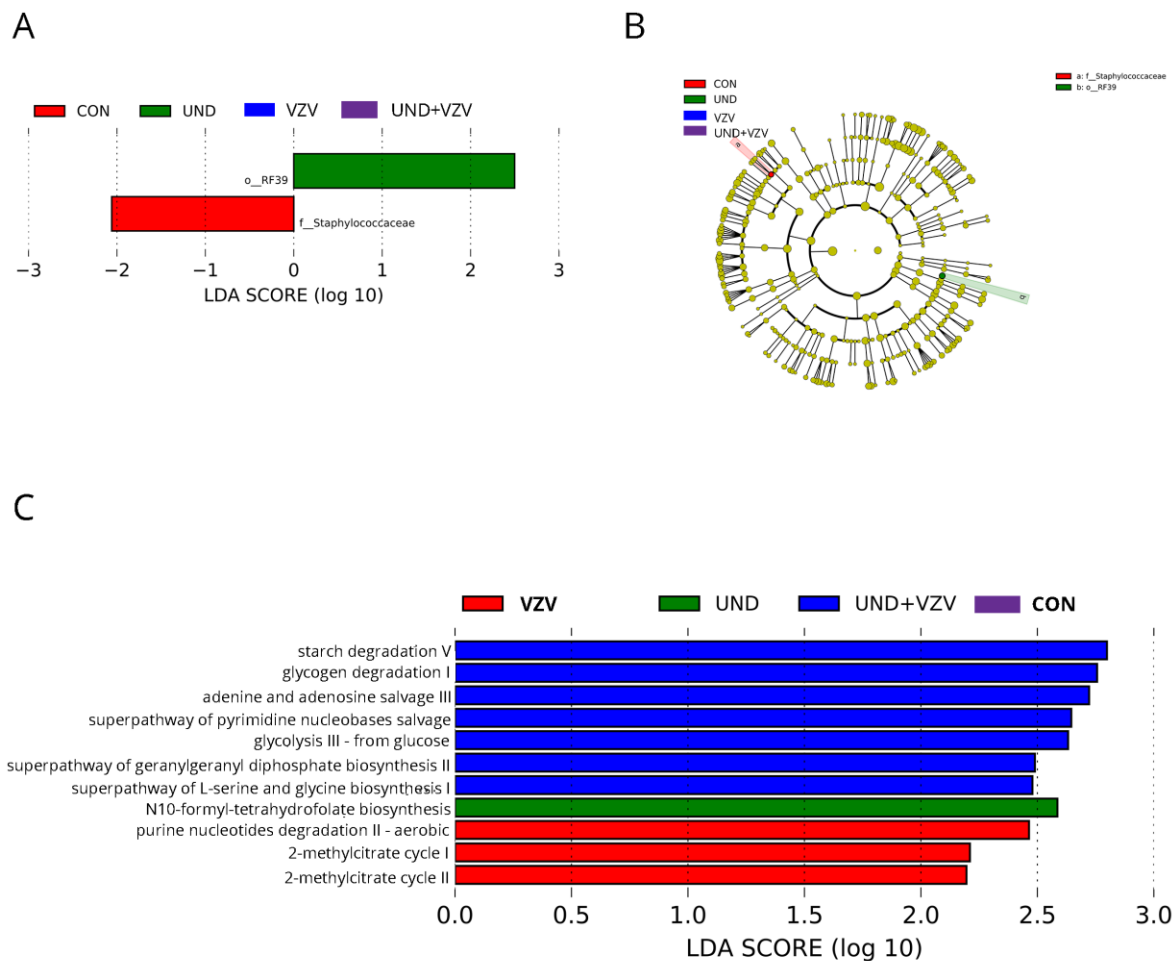
Legenda. Riqueza e diversidade de amostras de fezes de camundongos C57BL/6 CON (n=6), VZV (n=6), UND (n=6) e UND+VZV (n=6) ao final do período experimental. A)

Análise da abundância relativa dos filos presentes nas amostras. B) Diagrama de caixa representando medidas de diversidade alfa (índices: *Observed*, Chao1, Shannon, Simpson) nos grupos CON (verde escuro), VZV (verde claro), UND (vermelho) e UND+VZV (laranja). C) Análise de coordenadas principais dos índices de diversidade de Bray-Curtis para os grupos CON (verde escuro), VZV (verde claro), UND (vermelho) e UND+VZV (laranja). As comparações dos animais CON, VZV, UND e UND+VZV foram realizadas pelos testes de ANOVA seguido do teste de Tukey para dados paramétricos e teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para dados não-paramétricos.

A análise de LEfSe para identificação de taxa significativas demonstrou diferenças em apenas dois taxa quando levado em consideração os 4 grupos experimentais (Figura 16A). O grupo CON apresentou um aumento significativo na família *Staphylococcaceae*, enquanto o grupo UND demonstrou aumento significativo da ordem RF39 (filo *Tenericutes*). Os grupos VZV e UND+VZV não demonstraram presença significativa de nenhum táxon em relação aos demais grupos. A Figura 16B mostra a representação em cladograma das alterações observadas na microbiota intestinal pela técnica de LEfSe.

A análise da funcionalidade da microbiota por LEfSe demonstrou alterações em 11 vias metabólicas distribuídas entre os grupos CON, VZV, UND e UND+VZV (Figura 16B). O grupo VZV apresentou alterações em vias metabólicas relacionadas com a degradação de carboxilato e com a degradação de nucleotídeos de purinas. Já o grupo UND apresentou alteração apenas na via de biossíntese de folato [*N10-formyl-tetrahydrofolate biosynthesis* ($0,103 \pm 0,002$ CON vs. $0,103 \pm 0,002$ VZV vs. $0,104 \pm 0,001$ UND vs. $0,102 \pm 0,001$ UND+VZV)]. Finalmente o grupo UND+VZV demonstrou alterações em vias metabólicas de geração de precursores de metabolitos e energia, de metabolitos secundários, de biossíntese de nucleotídeos pirimidina e de biossíntese de aminoácidos, além da participação em vias de degradação de carboidratos [*glycogen degradation I* ($0,117 \pm 0,003$ CON vs. $0,120 \pm 0,005$ VZV vs. $0,120 \pm 0,002$ UND vs. $0,122 \pm 0,002$ UND+VZV); *starch degradation V* ($0,114 \pm 0,005$ CON vs. $0,119 \pm 0,007$ VZV vs. $0,117 \pm 0,002$ UND vs. $0,120 \pm 0,002$ UND+VZV)] e biossíntese de nucleotídeos purina [*adenine and adenosine salvage III* ($0,107 \pm 0,006$ CON vs. $0,109 \pm 0,0008$ VZV vs. $0,111 \pm 0,001$ UND vs. $0,111 \pm 0,002$ UND+VZV)].

Figura 16. A composição e funcionalidade da microbiota intestinal de camundongos desnutridos e vacinados (UND e UND+VZV) apresenta características similares aos grupos saudáveis (CON e VZV) após 20 semanas de reestabelecimento alimentar.



Fonte: Eslabão (2021)

Legenda. Clados taxonômicos e vias metabólicas alterados significativamente em amostras de fezes de camundongos C57BL/6 CON (n=6), VZV (n=6), UND (n=6) e UND+VZV (n=6) ao final do experimento. A) Análise discriminante linear (LDA) com base no tamanho do efeito (LEfSe) para composição da microbiota de camundongos C57BL/6 CON (n=6), VZV (n=6), UND (n=6) e UND+VZV (n=6). B) Cladograma da análise discriminante linear (LDA) com base no tamanho do efeito (LEfSe) para composição da microbiota de camundongos C57BL/6 CON (n=6), VZV (n=6), UND (n=6) e UND+VZV

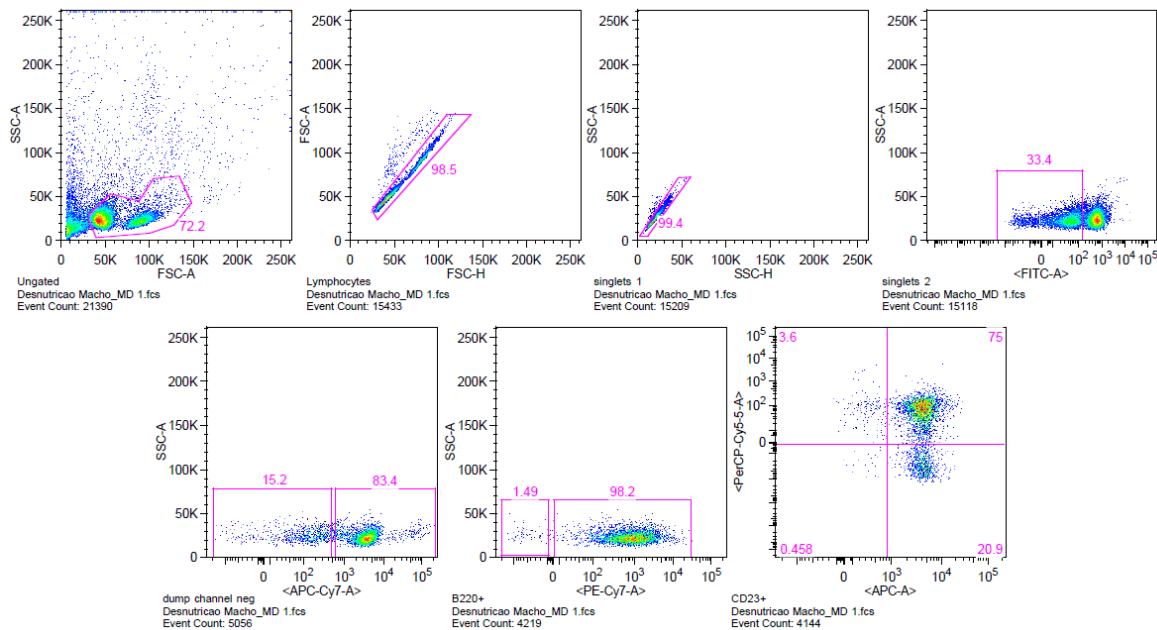
(n=6). C) Análise discriminante linear (LDA) com base no tamanho do efeito (LEfSe) para funcionalidade metabólica da microbiota de camundongos C57BL/6 CON (n=6), VZV (n=6), UND (n=6) e UND+VZV (n=6). Dados apresentados em score LDA (log10) dos táxons aumentados significativamente ($p < 0,05$). O algoritmo LEfSe utiliza o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para detectar diferenças nas abundâncias dos táxons, seguido do teste U de Mann-Whitney para identificar as significâncias biológicas das condições delimitadas.

Em síntese, considerando que o grupo UND+VZV apresentou o maior número de rotas metabólicas alteradas em comparação a os outros grupos experimentais, poderia indicar que as alterações da microbiota intestinal induzidas pela desnutrição na infância poderiam implicar na alteração funcional dos camundongos em resposta à imunização com VZV.

5.3.5 Desnutrição durante a infância resulta em alterações no compartimento de células B em camundongos C57BL/6 adultos.

O efeito a curto prazo da desnutrição na resposta imune de camundongos C57BL/6 foi avaliado através da imunofenotipagem do compartimento de células B por citometria de fluxo de esplenócitos. O ensaio avaliou as populações de linfócitos B maduros, de memória, percussoras de memória, de centro germinativo e foliculares. A estratégia de análise de populações (*gates*) está apresentada na figura 17.

Figura 17. Estratégia de *gates* utilizada para as análises de citometria de fluxo da resposta imune de células B em camundongos C57BL/6.

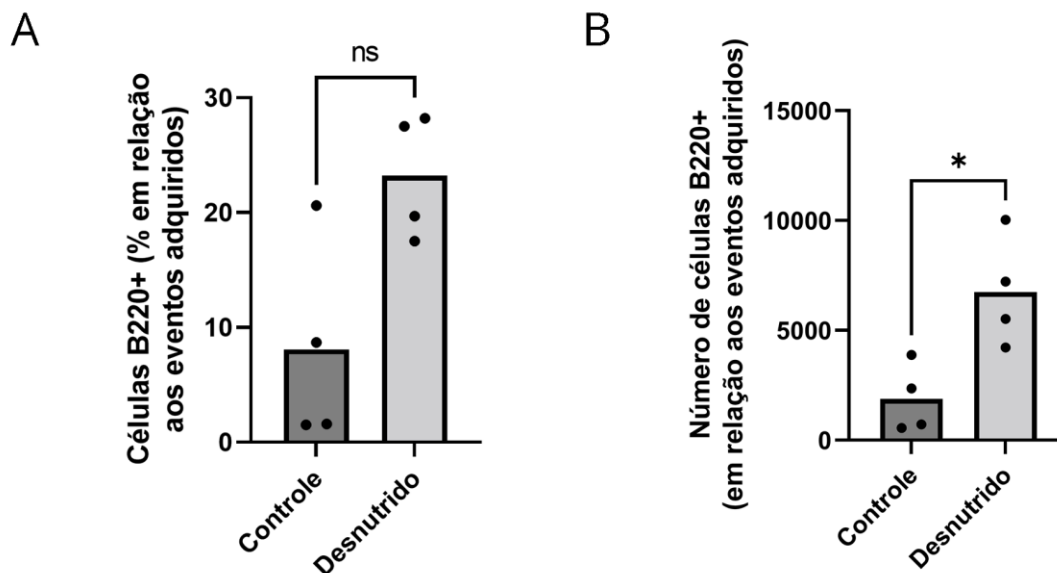


Fonte: Eslabão (2021)

Legenda. *Gates* identificando as populações de linfócitos B (B220, CD23, GL7 e CD38).

Primeiramente, foram comparadas as respostas imunológicas com relação a indução de células B maduras nos camundongos C57BL/6 pertencentes aos grupos controle e desnutrição (Figura 18). Os camundongos dos grupos desnutrição tendem a apresentar um aumento na frequência em porcentagem de células B maduras em relação ao total de eventos analisados quando comparados aos camundongos controle (5,13 CON vs. 23,6 UND; $p = 0,1143$). Já quando analisamos o total de células B maduras, o grupo desnutrição apresenta um aumento significativo dessa população em relação ao grupo controle (1539 CON vs. 6369 UND; $p = 0,0286$).

Figura 18. A desnutrição apresenta efeito na resposta imune a curto prazo, alterando a presença de células B maduras em relação ao número total.

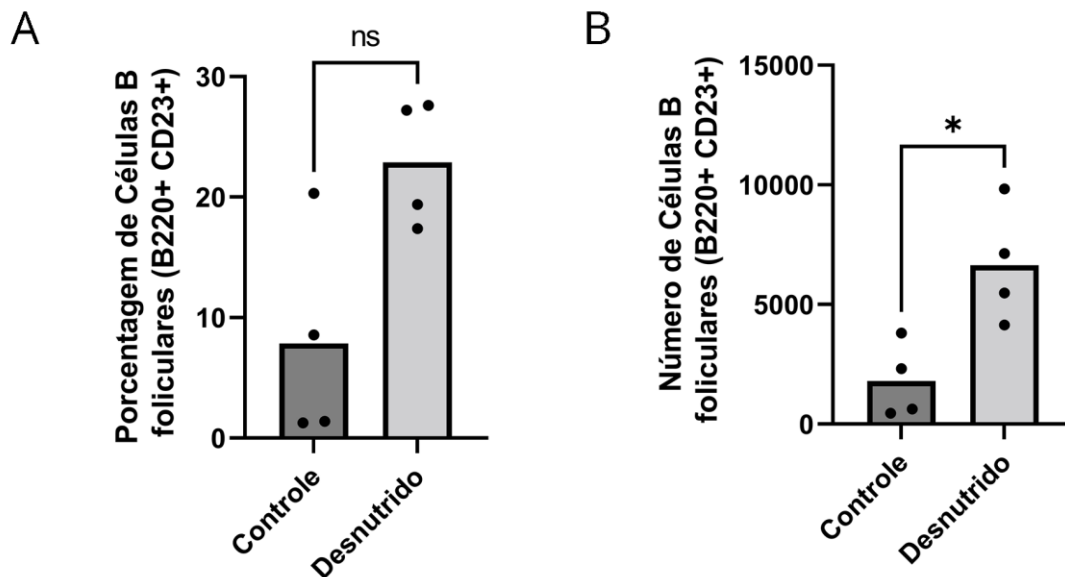


Fonte: Eslabão (2021)

Legenda. Análises da população de células B220+ presentes no cultivo de esplenócitos de camundongos C57BL/6 de animais controle ($n = 4$) e desnutridos ($n = 4$). A) Frequência em porcentagem de células B220+ em relação ao total de eventos analisados. B) Número de células B220+. A comparação entre os grupos por estímulo específico foi realizada pelo teste U de Mann-Whitney. Dados apresentados como média. ns - sem significância estatística; * $p < 0,05$.

As respostas imunológicas com relação a indução de células B foliculares foram avaliadas nos camundongos C57BL/6 pertencentes aos grupos CON e UND (Figura 19). Os camundongos dos grupos UND apresentam uma tendência de aumento na frequência em porcentagem de células B foliculares em relação ao total de eventos analisados quando comparados aos camundongos controle (4,965 CON vs. 23,30 UND; $p = 0,1143$). Com relação ao total de células B foliculares, o grupo desnutrição apresenta um aumento significativo dessa população em relação ao grupo CON (1475 CON vs. 6309 UND; $p = 0,0286$).

Figura 19. A desnutrição apresenta efeito na resposta imune a curto prazo, alterando a presença de células B foliculares.



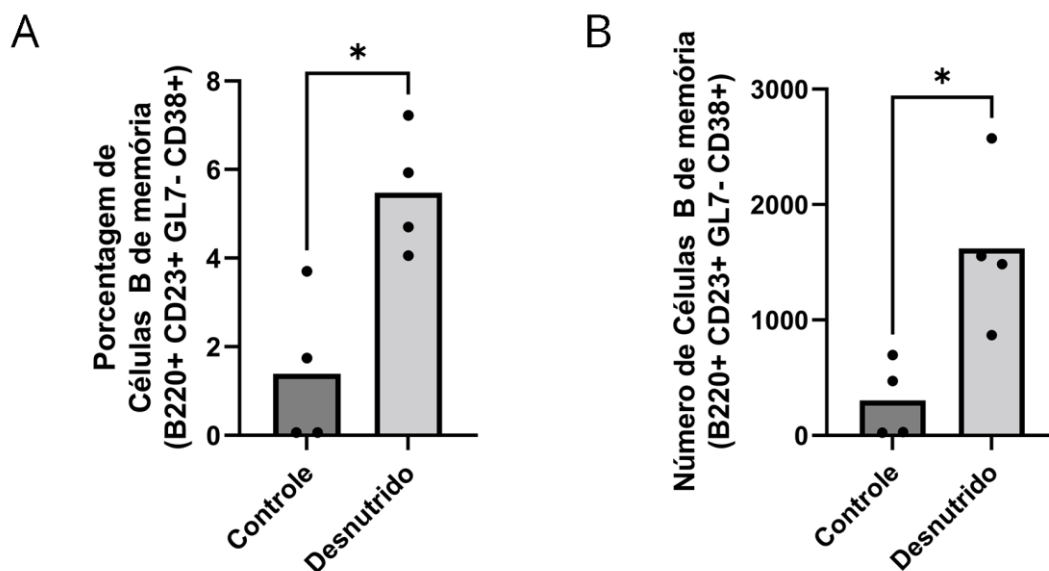
Fonte: Eslabão (2021)

Legenda Análises da população de células B foliculares (B220+ CD23+) presentes no cultivo de esplenócitos de camundongos C57BL/6 de animais CON (n = 4) e UND (n = 4). A) Frequência em porcentagem de células B foliculares em relação ao total de eventos analisados. B) Número de células B foliculares. A comparação entre os grupos por estímulo específico foi realizada pelo teste U de Mann-Whitney. Dados apresentados como média. ns - sem significância estatística; * $p < 0,05$.

As respostas imunológicas com relação a indução de células B de memória foram avaliadas nos camundongos C57BL/6 pertencentes aos grupos CON e UND (Figura 20). Os camundongos dos grupos UND apresentam um aumento significativo na frequência em porcentagem de células B de memória em relação ao total de eventos analisados quando comparados aos camundongos CON (0,901 CON vs. 5,315 UND; $p = 0,0286$). Já quando

analisamos o total de células B de memória, o grupo UND apresenta um aumento significativo dessa população em relação ao grupo CON (250 CON vs. 1519 UND; $p = 0,0286$).

Figura 20. A desnutrição apresenta efeito na resposta imune a curto prazo, alterando a presença de células B de memória tanto em relação a frequência quanto ao número total.



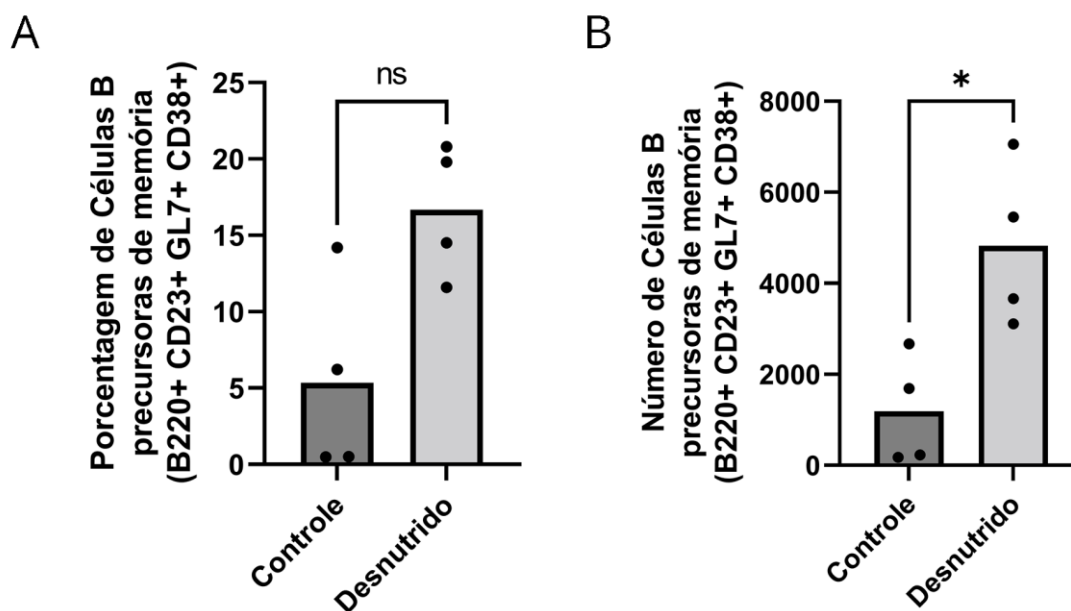
Fonte: Eslabão (2021)

Legenda. Análises da população de células B de memória (B220+ CD23+ GL7- CD38+) presentes no cultivo de esplenócitos de camundongos C57BL/6 de animais CON ($n = 4$) e UND ($n = 4$). A) Frequência em porcentagem de células B de memória em relação ao total de eventos analisados. B) Número de células B de memória. A comparação entre os grupos por estímulo específico foi realizada pelo teste U de Mann-Whitney. Dados apresentados como média. * $p < 0,05$.

As respostas imunológicas com relação a indução de células B precursoras de memória foram avaliadas nos camundongos C57BL/6 pertencentes aos grupos CON e

UND (Figura 21). Os camundongos dos grupos desnutrição apresentam uma tendência de aumento na frequência em porcentagem de células B precursoras de memória em relação ao total de eventos analisados quando comparados aos camundongos CON (3,367 CON vs. 17,15 UND; $p = 0,0571$). Com relação ao total de células B precursoras de memória, o grupo UND apresenta um aumento significativo dessa população em relação ao grupo CON (962,5 CON vs. 4560 UND; $p = 0,0286$).

Figura 21. A desnutrição apresenta efeito na resposta imune a curto prazo, alterando a presença de células B precursoras de memória.

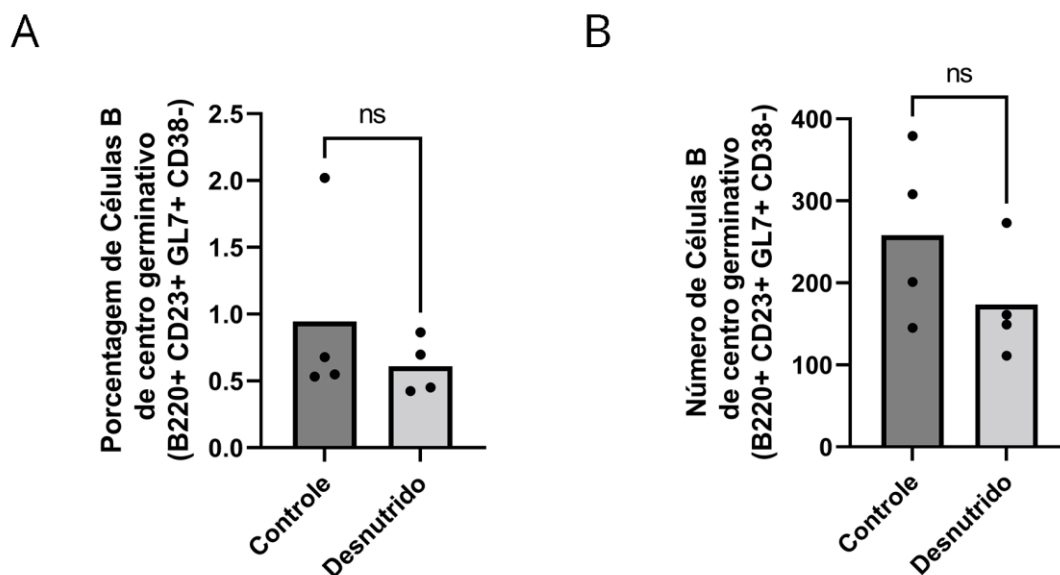


Fonte: Eslabão (2021)

Legenda. Análises da população de células B precursoras de memória (B220+ CD23+ GL7+ CD38+) presentes no cultivo de esplenócitos de camundongos C57BL/6 de animais CON ($n = 4$) e UND ($n = 4$). A) Frequência em porcentagem de células B precursoras de memória em relação ao total de eventos analisados. B) Número de células B precursoras de memória. A comparação entre os grupos por estímulo específico foi realizada pelo teste U de Mann-Whitney. Dados apresentados como média. ns - sem significância estatística; * $p < 0,05$.

Finalmente, as respostas imunológicas com relação a indução de células B de centro germinativo foram avaliadas nos camundongos C57BL/6 pertencentes aos grupos CON e UND (Figura 22). Os camundongos dos grupos UND apresentam uma tendência de redução na frequência em porcentagem de células B de centro germinativo em relação ao total de eventos analisados quando comparados aos camundongos CON (0,613 CON vs. 0,574 UND; $p = 0,685$). Com relação ao total de células B de centro germinativo, o grupo UND também apresenta uma tendência de redução dessa população em relação ao grupo CON (254,5 CON vs. 155 UND; $p = 0,342$). Entretanto, não encontramos diferenças estatísticas entre os grupos para a população analisada.

Figura 22. A desnutrição não influencia a resposta imune a curto prazo com relação as células B centro germinativo.



Fonte: Eslabão (2021)

Legenda. Análises da população de células B de centro germinativo (B220+ CD23+ GL7+ CD38-) presentes no cultivo de esplenócitos de camundongos C57BL/6 de animais CON (n = 4) e UND (n = 4). A) Frequência em porcentagem de células B de centro germinativo em relação ao total de eventos analisados. B) Número de células B de centro germinativo. A

comparação entre os grupos por estímulo específico foi realizada pelo teste U de Mann-Whitney. Dados apresentados como média. ns - sem significância estatística.

6 DISCUSSÃO

A desnutrição é a responsável por grande parte dos casos de morte infantil com cerca de 1 a 6 milhões de mortes em crianças com idade abaixo de 5 anos todo ano, fazendo-se necessária uma maior compreensão do estabelecimento e das repercussões dessa condição (MILLION; DIALLO; RAOULT, 2017). Nesse trabalho, analisamos as consequências da desnutrição proteico-energética durante a infância de camundongos C57BL/6 machos e fêmeas quanto às alterações de alguns parâmetros morfométricos, assim como em relação as alterações na composição e funcionalidade da microbiota intestinal e suas possíveis repercussões no sistema imune.

Primeiramente, consolidamos o modelo experimental murino para desnutrição proteico-energética infantil desenvolvido pelo nosso grupo no trabalho de Gubert (2020), a partir da adaptação de um modelo já estabelecido por Mittal e Woodward (1985) no estudo dos efeitos da desnutrição severa nas células epiteliais do timo de camundongos. No presente trabalho, fomos capazes de reafirmar os parâmetros observados anteriormente pelo nosso grupo, entre eles destacamos o comportamento na variação do peso durante a indução da desnutrição e posteriormente durante a recuperação alimentar dos camundongos como indicativo do desenvolvimento desses animais. Gubert (2020) padronizou o protocolo de desnutrição com base nas curvas de consumo diário de ração e no ganho de peso diário, levando em consideração o dimorfismo sexual de tamanho e de consumo de alimento dos camundongos C57BL/6. Além disso, Gubert caracterizou o padrão dos parâmetros bioquímicos de animais machos desnutridos e controle. O modelo de desnutrição apresentou redução nos parâmetros proteínas totais e globulinas, além do aumento na relação albumina/globulina.

Como esperado, os animais que passaram pelo protocolo de desnutrição demonstraram uma redução significativa no peso durante a restrição alimentar, não acompanhando a curva de ganho de peso observada nos animais controle. O período de aplicação do protocolo de desnutrição, entre a 3ª semana e a 6ª de vida do animal, consiste no período caracterizado pelo maior ganho de peso nos animais saudáveis. Ou seja, esse período de 3 semanas é compatível com a infância desses animais, caracterizado pelo rápido crescimento com aumento exponencial no peso e no comprimento dos indivíduos.

Esses animais vão atingir a vida adulta, maturidade sexual, a partir da 7ª semana de vida (KEMPERMANN; KUHN; GAGE, 1997).

O hormônio do crescimento (*growth hormone* - GH) é o responsável pelo controle do crescimento pós-natal, regulando a produção do fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (*insulin-like growth fator-1* – IGF-1) pelo fígado e tecidos periféricos (KAPLAN; COHEN, 2007; SCHWARZER et al., 2016). Durante a desnutrição crônica, um estado de resistência ao GH é instaurado levando a características de *stunting*, já durante a desnutrição aguda, a mediação da perda de peso é causada em parte pela microbiota o que resulta em um decréscimo severo no peso do indivíduo (SCHWARZER et al., 2016; SMITH et al., 2013). Schwarzer *et al.* (2016) demonstraram que a ausência de microbiota em camundongos fêmeas resulta em redução significativa do peso e na redução da produção de IGF-1, mesmo recebendo uma dieta idêntica à administrada aos camundongos controle selvagens. Entretanto, após a monocolonização com *Lactobacillus plantarum*, as irregularidades no crescimento e na resposta hormonal desses animais eram amenizadas. Esses dados sugerem que a microbiota possui um papel importante no crescimento durante a infância, sendo capaz de influenciar a atividade do eixo somatotrófico.

Durante o período compreendido pelo protocolo de desnutrição, ocorre o maior ganho de peso diário para os animais alocados no grupo CON, por outro lado, os animais alocados no grupo UND não conseguem ganhar peso, resultando em perda de peso em alguns casos. Os machos CON apresentam um ganho de peso diário cerca de 3 vezes maior que o grupo de machos UND, enquanto as fêmeas CON apresentam um ganho de peso diário cerca de 4 vezes maior que o grupo de fêmeas UND. No ponto máximo da diferença de peso, que coincide com o final do período de restrição alimentar, o peso dos animais CON é cerca de 0,53 vezes mais que do UND.

Entretanto, o quadro observado durante o protocolo de desnutrição é revertido após a introdução do protocolo de recuperação alimentar. Os animais pertencentes aos grupos UND dobraram de peso em um curto período de apenas duas semanas, igualando seus pesos com o peso dos animais CON. Sendo que o ganho de peso diário para os animais

machos UND se mostrou cerca de 3 vezes maior quando comparados com os machos CON, e 2 vezes maior para as fêmeas UND quando comparados com as fêmeas CON.

Além dos resultados obtidos em relação ao peso dos animais, a desnutrição também resultou em redução do tamanho dos animais durante a aplicação do protocolo, enquanto o protocolo de recuperação reestabeleceu o comprimento dos animais. Entretanto, não foi possível obter esses dados ao longo do experimento pela dificuldade de contenção dos animais. Optamos por não utilizar anestésico para obter esses dados morfométricos, pois tentamos ao minimizar manipulações, estímulos e tratamentos que pudessem interferir com a avaliação à curto e longo prazo da microbiota comensal. Como alternativa, buscamos avaliar o tamanho de cauda dos animais ao final do experimento, o qual é utilizado como um marcador para acessar o comprimento do camundongo, sendo que camundongos desnutridos apresentam uma redução no tamanho da mesma (BROWN et al., 2015). Entretanto, nossos dados não demonstraram diferenças significativas entre o tamanho da cauda dos animais em experimentação.

Nossos dados também demonstraram algumas alterações nas características dos órgãos dos animais em experimentação que podem estar relacionados tanto com a redução na ingestão de nutrientes quanto com a composição da microbiota durante a infância. Analisando os dados de alguns órgãos, é possível observar uma tendência dos animais machos UND a possuírem um maior peso e um maior tamanho de órgão do que os animais CON (Figura e Tabela). Enquanto, as fêmeas UND tendem a apresentar uma redução no peso e no tamanho dos órgãos analisados quando comparadas com as fêmeas CON. Entretanto, diferenças significativas foram identificadas apenas no aumento do comprimento intestino delgado de camundongos machos UND e nas medidas do coração de camundongos machos UND e fêmeas UND ao final do período experimental, correspondendo a 20 semanas após o término da recuperação alimentar.

Nosso estudo demonstrou redução de peso significativa apenas no coração das fêmeas UND, enquanto os machos UND apresentaram um aumento no peso desse órgão (Figura 5). Nossos dados corroboram com os descritos por Ferguson *et al.* (2019), os quais demonstraram que a indução de desnutrição durante os primeiros 21 dias de vida em camundongos fêmeas resultou na redução desproporcional do peso do coração e da

capacidade de realizar exercícios, além de limitações na função diastólica cardíaca e resposta da frequência cardíaca à estimulação adrenérgica. Entretanto, essas e outras alterações analisadas no estudo não foram observadas em camundongos machos submetidos a mesma restrição alimentar (FERGUSON et al., 2019).

Visker e Ferguson (2018) demonstraram que a indução de desnutrição pós-natal em camundongos através do controle da dieta materna, com administração de uma dieta com 8% de proteína, resultou em redução no peso do coração dos filhotes cerca de 80 dias após o nascimento. Vale ressaltar que os autores analisaram a indução da desnutrição em três diferentes tempos, durante os primeiros 21 dias de vida, durante os 10 primeiros dias de vida e entre os 10 primeiros dias e o dia 21, sendo que todos os grupos demonstraram redução no peso do coração (VISKER; FERGUSON, 2018). As primeiras semanas de vida de um camundongo é caracterizado pela fase proliferativa dos cardiomiócitos e pela maturação do sistema de condução elétrica (BOTTING et al., 2012; VISKER; FERGUSON, 2018). No final desse período, os cardiomiócitos passam por divisão nuclear, mas não celular, o que resulta em cardiomiócitos binucleados. A partir desse período dá-se início ao período de hipertrofia do cardiomiócitos, caracterizado pelo aumento da área transversal visando a elevação da força contráctil (BOTTING et al., 2012). Portanto, qualquer alteração na disponibilidade de nutrientes durante esse período de desenvolvimento pós-natal do coração pode resultar em alterações na estrutura e função desse órgão durante a vida de um indivíduo (VISKER; FERGUSON, 2018).

A microbiota intestinal é capaz de influenciar o desenvolvimento do indivíduo como um todo, atuando até em órgãos distantes que não possuem contato direto com seus componentes ou metabólitos. Gubert (2020) demonstrou redução no tamanho do intestino grosso de camundongos machos desnutridos, além de redução no peso do baço tanto em machos desnutridos quanto em fêmeas. Schwarze *et al.* (2016) demonstraram redução no tamanho do baço, fígado, coração e rim em camundongos fêmeas GF, alterações que foram revertidas pela monocolonização por *Lactobacillus plantarum*.

Essas variações observadas na literatura e nos nossos dados referentes ao tamanho e ao peso de órgãos podem ser decorrentes da redundância de funções exercida por diferentes microrganismos constituintes da microbiota. Animais GF apresentam as

alterações mais marcantes no tamanho, no peso e nas funções dos órgãos. Enquanto isso, tratamentos e patologias que resultam em alterações mais sutis ou transientes na composição da microbiota resultam em alterações em órgãos distintos, dependendo dos microrganismos reduzidos ou favorecidos sobre essas determinadas pressões ambientais, além da presença de outros constituintes do microbioma que sejam capazes de suprir ou reprimir as funções exercidas pelas alterações desse microrganismo específico.

Assim, validamos o protocolo de desnutrição proteico-energética infantil desenvolvido anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (Gubert, 2020). Demonstramos que o período de 3 semanas de restrição alimentar iniciado logo após o desmame é capaz de resultar em animais com metade do peso apresentado por animais saudáveis. Além disso, demonstramos que o período de recuperação alimentar foi suficiente para reestabelecer o crescimento dos animais que foram submetidos a desnutrição. Todavia, algumas alterações no tamanho e no peso de órgãos ainda são observadas durante a vida adulta desses animais.

Na caracterização do perfil de microbiota intestinal de camundongos C57BL/6 submetidos ao protocolo de desnutrição durante a infância foi empregado o sequenciamento por síntese com base na identificação de regiões variáveis V3 e V4 do gene 16S rRNA.

No Capítulo I dessa tese demonstramos que a desnutrição durante a infância resulta em diversas alterações na composição e na funcionalidade da microbiota intestinal, com alterações principalmente na abundância de Bacteroidetes e Firmicutes, além de diferenças significativas nas análises intragrupos. Entretanto, a OMS preconiza o uso profilático de SXT durante casos de desnutrição mesmo sem infecção aparente, diretriz que nos levou a avaliar o tratamento com SXT durante a desnutrição, pois resulta em um paradoxo desde o ponto de vista da microbiota já que é bem sabido que os antibióticos são as principais drogas indutoras de disbiose, a qual poderia dificultar a recuperação plena do indivíduo desnutrido. Primeiramente, buscamos estabelecer o impacto do SXT em camundongos saudáveis. Demonstramos alterações na riqueza da comunidade da microbiota intestinal e da composição dessa comunidade em comparações intragrupos. Além disso, demonstramos que o SXT resulta em redução de 15 taxa e alteração de vias metabólicas associadas a esses microrganismos. Portanto, demonstramos que o uso profilático em camundongos saudáveis resulta em disbiose da microbiota intestinal. Após o

estabelecimento dos efeitos do SXT, finalmente avaliamos a influência do tratamento com SXT em animais desnutridos. Demonstramos que a associação da desnutrição e do uso de antibióticos resulta em um terceiro perfil de microbiota intestinal, com redução de 18 taxa, alteração na composição da comunidade nas análises intragrupos e alteração no perfil metabólico desses animais.

Esses resultados nos levaram a questionar sobre o impacto a curto prazo da desnutrição, ou seja, se um período curto de duas semanas de recuperação alimentar de forma gradual seria capaz de alterar a disbiose observada após a desnutrição. Para isso, buscamos identificar a composição e funcionalidade da microbiota intestinal de camundongos C57BL/6 que passaram pela desnutrição na infância após administração do protocolo de recuperação alimentar.

A composição da microbiota intestinal após o protocolo de recuperação alimentar demonstrou alterações significativas tanto a nível de filo quanto de gênero bacteriano. O filo Proteobacteria se mostra em maior abundância em animais CON quando comparados com animais UND. Esse filo está presente principalmente na microbiota intestinal de crianças obesas, enquanto o filo Firmicutes tem maior representação em crianças desnutridas. Esse fato se deve ao elevado consumo de gordura, resultando em um aumento exarcebado de Proteobacteria (MÉNDEZ-SALAZAR et al., 2018). Entretanto, em populações de crianças denutridas em Bangladesh, o filo Proteobacteria corresponde cerca de 46% da abundância total, enquanto crianças saudáveis apresentam cerca de 5% da microbiota total. Essa alta presença de Proteobacteria foi associada com um possível aumento na abundância de microrganismos patogênicos (MONIRA et al., 2011). Assim, poderia-se sugerir que o aumento de Proteobacterias nos animais CON pode estar relacionado então com a disposição *ad libitum* de alimentos e favorecimento do ganho de peso principalmente durante período de rápido crescimento como a infância.

Já o filo Bacteroidetes foi observado em maior abundância nos animais UND quando comparados com os animais CON. Turnbaugh *et al.* (2009) demonstraram que tanto a presença de Bacteroidetes quanto a presença de genes relacionados com o metabolismo de carboidratos se encontravam em maiores abundâncias em indivíduos com o fenótipo magro, enquanto indivíduos obesos apresentavam aumento nas abundâncias de Firmicutes e

de genes de transporte de nutrientes. Os pesquisadores identificaram 42% dos genes associados ao fenótipo magro pertencendo ao filo Bacteroidetes (TURNBAUGH et al., 2009a, 2009b). Outro estudo comparando a microbiota intestinal de crianças de regiões rurais da África com crianças italianas demonstrou um aumento de Bacteroidetes nas crianças africanas, provavelmente devido ao consumo de dietas a base de plantas originárias da África que resulta em seleção de microrganismos melhor adaptados para extrair energia de fontes vegetais (KRAJMALNIK-BROWN et al., 2012). Entretanto, o quadro clínico de marasmo foi associado com um perfil de microbiota intestinal caracterizado pela redução de Bacteroidetes, enquanto o quadro de kwashiorkor é associado com o aumento de Proteobacteria (PHAM et al., 2019).

Os gêneros *Dorea*, *Ruminococcus* e *Coprococcus* também foram encontrados em maior abundância em camundongos CON quando comparados com o grupo UND. Estudos demonstraram que esses gêneros se encontram reduzidos durante o processo de desnutrição (MILLION; DIALLO; RAOULT, 2017; SUBRAMANIAN et al., 2014). A presença do gênero *Dorea* já foi relacionada com a redução na inflamação sistêmica em pacientes com cirrose e encefalopatia hepática (BAJAJ et al., 2012). Esses dados sugerem que, mesmo após o reestabelecimento alimentar, os camundongos UND ainda não apresentam uma microbiota capaz de modular processos inflamatórios, tornando-os susceptíveis a respostas imunes errôneas tanto após estímulos ambientais e contato com patógenos quanto após a vacinação. Além disso, estudo com camundongos colonizados com a microbiota intestinal de crianças desnutridas do Malawi demonstrou que a administração de *Ruminococcus gnavus* nesses camundongos foi capaz de amenizar os efeitos da desnutrição no crescimento e nas alterações metabólicas observadas (BLANTON et al., 2016). Pode-se supor assim, que a redução de representantes de *Ruminococcus* demonstrada pelo protocolo de desnutrição nos animais UND contribui com as alterações observadas no peso e no metabolismo (Capítulo I, Figura 2), sendo que os níveis de abundância dessa comunidade não retomam ao níveis correspondentes observados nos animais CON nem mesmo após a recuperação alimentar (Figura 12).

Entretanto, também observamos um aumento nos animais UND do gênero *Akkermansia*, representante do filo Verrucomicrobia, o qual foi identificado como um dos

responsáveis por manter um estado anti-inflamatório, melhorar a sensibilidade a insulina, melhorar o metabolismo de glicose, manter as funções da barreira epitelial e auxiliar no controle da obesidade através da dieta (AHMAD et al., 2019; EVERARD et al., 2013; FUJIO-VEJAR et al., 2017).

Portanto, nossos dados de composição da microbiota do após o período de recuperação alimentar sugerem a manutenção no grupo UND de microrganismos correlacionados com a desnutrição e o fenótipo magro, além da redução de microrganismos capazes de modular a resposta imune. Porém, identificamos ainda a presença de *Akkermansia*, o que pode sugerir um reestabelecimento gradual da homeostase intestinal.

Diferenças também foram observadas nas vias metabólicas de camundongos CON e UND ao final do período de recuperação alimentar. Vias envolvidas na degradação de açúcares e biossíntese de amino ácidos encontravam-se mais presentes em camundongos CON do que no grupo contraparte. A degradação de açúcares exerce uma pressão seletiva forte na comunidade microbiana presente no intestino (MILANI et al., 2015; YU et al., 2021). A presença de *Bifidobacterium* foi associada com a fermentação de açúcares comuns (MILANI et al., 2015). No nosso estudo, observamos uma tendência do grupo CON em apresentar aumento no número de representantes do filo Actinobacteria, o que pode refletir no aumento da via de degradação de açúcares. Além disso, a via de degradação de fucose também foi encontrada em maior presença em camundongos CON. No intestino de crianças, a fucose é utilizada por *Bifidobacteria* como substrato para a produção de 1,2-propanediol, o qual é fermentado por outras bactérias comensais para a produção de propionato (SCHWAB et al., 2017). O propionato é um SCFA de importante papel na manutenção da homeostase intestinal devido sua capacidade de interação com as células do epitélio intestinal e influenciar as respostas imunes (REICHARDT et al., 2014). A presença de fucose livre no lúmen intestinal está correlacionada com a presença de atividade patogênica e bactérias exógenas e quebra da barreira mucosa (DE REPENTIGNY et al., 2000; MACFARLANE; HAY; GIBSON, 1989). O aumento de fucose livre resulta em um quadro inflamatório no intestino possivelmente através da via de receptores TLR-2, além de induzir a expressão de genes de citocinas responsáveis pelo estímulo da proliferação celular (CHOW; LEE, 2008). A presença de vias metabólicas de degradação de fucose em

camundongos CON pode indicar um intestino saudável com bactérias comensais capazes de modular processos inflamatórios. A baixa abundância de vias metabólicas de degradação de açúcares está relacionada com o quadro de obesidade, sugerindo alterações no balanço sacarose/glicogênio (ANGELAKIS et al., 2015). Demonstramos que as vias de degradação de sacarose e fucose se encontram em abundâncias reduzidas em camundongos UND quando comparados aos CON mesmo após o período de recuperação alimentar, dado pode estar relacionado com os primeiros sintomas do duplo fardo da desnutrição (*double burden of malnutrition* - DBM). O DBM é caracterizado pela coexistência de desnutrição durante a infância e doenças metabólicas e não-comunicáveis associadas a alimentação na vida adulta (SHI et al., 2018; WANG et al., 2020b). De fato, observamos que camundongos desnutridos machos já apresentam peso significativamente maior que os controles no final do período experimental analisado.

Nosso trabalho também demonstrou que, após a recuperação alimentar, camundongos CON apresentam uma maior abundância da via metabólica de interconversão de arginina, ornitina e prolina quando comparados com o grupo UND. Diferentemente do mecanismo de adultos, a síntese de arginina ocorre primariamente no intestino delgado em crianças, sendo altamente dependente do processo de interconversão de ornitina e de prolina pela microbiota local (BERTOLO et al., 2003). Arginina é um aminoácido precursor vital para a síntese não só de proteínas, prolina e ornitina, mas também de óxido nítrico, glutamato, citrulina, creatina e agmatina (WU; MORRIS, 1998). Ela está relacionada direta ou indiretamente através de seus produtos com a reparação tecidual, a cicatrização de feridas, modulação do fluxo sanguíneo, respiração mitocondrial e detoxificação de amônia (WU, 2009). Estudos com crianças desnutridas do Malawi e de Bangladesh demonstram reduções nos níveis plasmáticos de arginina quando comparados com crianças suecas saudáveis (KUMAR et al., 2018; SMITH et al., 2013; SUBRAMANIAN et al., 2014). Kumar *et al.* (2018) observaram que crianças desnutridas apresentam redução significativa dos níveis plasmáticos de aminoácidos essenciais (lisina, histidina, treonina, metionina, triptofano, isoleucina, leucina, fenilalanina e valina) e de aminoácidos não-essenciais quando comparados com crianças saudáveis. Nossos dados demonstram que, mesmo após o reestabelecimento alimentar, camundongos UND não possuem níveis equivalentes aos animais CON de vias metabólicas associadas com a

biossíntese de lisina, metionina, treonina, arginina, ornitina e prolina. Estudo analisando a doença granulomatosa crônica, imunodeficiência primária caracterizada pela falha na explosão oxidativa de fagócitos geralmente associada a colite e anemia, demonstrou que a presença de vias metabólicas responsáveis pela biossíntese de metionina na microbiota intestinal está correlacionada negativamente com marcadores inflamatórios, sugerindo uma mediação da inflamação sistêmica (DAVRANDI et al., 2021). Levando em consideração os resultados apresentados no Capítulo I (Figura 2), podemos observar que animais UND apresentavam alterações apenas nas vias metabólicas de lisina e de arginina quando comparados aos animais CON. Esses dados indicam que a recuperação alimentar em camundongos UND não foi capaz de contornar o déficit de vias metabólicas de aminoácido, mas sim agravou a disparidade entre os grupos.

Além disso, os animais UND apresentaram um aumento no ciclo da ureia, responsável pela degradação de aminoácidos, o que pode resultar em uma maior redução na disponibilidade de aminoácidos (SNELSON et al., 2021). O aumento no ciclo da ureia também resulta em aumento de amônia e de ureia no organismo, o que pode contribuir para um quadro de uremia e desintegração da barreira epitelial no intestino (VAZIRI et al., 2012). Entretanto, no Capítulo I (Figura 3) demonstramos que o uso profilático de SXT durante o quadro de desnutrição é responsável pela redução dos níveis do ciclo da ureia, o que pode remediar essas alterações observadas durante a desnutrição. Devemos expandir nossas investigações do uso profilático de antibióticos na desnutrição para podermos confirmar essa hipótese.

A via de degradação de L-ramnose também se encontra aumentada em camundongos UND após o período de recuperação alimentar. A síntese de L-ramnose é relacionada com a redução dos níveis séricos de triacilglicerol e na prevenção de obesidade, atuando na manutenção do peso corporal (DRISSI et al., 2014; VOGT et al., 2006). Nosso estudo demonstrou o aumento na degradação dessa molécula, o que pode significar que a microbiota dos camundongos UND tenta estimular o ganho de peso através do favorecimento de vias de degradação de L-ramnose.

Também observamos nos camundongos UND um aumento da via de biossíntese de preQ0, a qual está relacionada com a biossíntese de folato (vitamina B9). O folato tem

papel importante na manutenção de células Treg, sendo que a deficiência em vitamina B9 resulta em inflamação intestinal (HIRATA; KUNISAWA, 2017; KUNISAWA et al., 2012). Essas alterações também foram observadas nos camundongos UND após o período de desnutrição (Capítulo I, Figura 2). Esses dados nos fazem supor a ação de um mecanismo de regulação de um possível quadro de inflamação intestinal decorrente da desnutrição através do estímulo de vias metabólicas pela microbiota intestinal. Notamos também que a via de pentose fosfato segue as mesmas características que a via de preQ0, camundongos UND apresentam aumento da via de pentose fosfato ao final do protocolo de desnutrição (Capítulo I, Figura 2) e ao final do protocolo de recuperação. A via de pentose fosfato está envolvida com a oxidação de glicose e se mostra aumentada em casos de redução nas reservas de glicogênio do corpo durante períodos de consumo insuficiente de carboidratos (ZHAO et al., 2018). Supomos que a presença dessa via em camundongos UND se deva a limitação de carboidratos na dieta dos animais, não sendo revertida com a restauração alimentar de curto prazo.

Já a biossíntese de peptidoglicanos pela microbiota intestinal está sendo relacionada com doenças metabólicas, entre elas a resistência à insulina em indivíduos obesos, inflamação metabólica e esteatose hepática (JIN et al., 2020; YUAN et al., 2021). A administração de peptidoglicanos em camundongos com dietas saudáveis resultou no estímulo da lipogênese hepática, com aumento dos níveis hepáticos de triglicerídeos, inflamação e fibrose, além do aumento sérico de triglicerídeos, colesterol, insulina e citocinas inflamatórias (JIN et al., 2020). Nosso estudo observou um aumento da via de maturação de peptidoglicanos, novamente sugerindo alterações na funcionalidade da microbiota intestinal que podem resultar em síndromes metabólicas na vida adulta.

Finalmente, destacamos também o aumento da biossíntese de antígeno O nos animais UND após a recuperação alimentar. O antígeno O compõem os lipopolissacarídeos (LPS) de membrana externa de bactérias. O aumento da via de biossíntese de antígeno O sugere um aumento de LPS no intestino. Estudos relacionaram a presença de LPS com quadros de translocação microbiana, autoimunidade e perfis pró-inflamatórios (CHEN et al., 2021; OGUNRINDE et al., 2019; VATANEN et al., 2016). Espécies de *Bacteroides* na microbiota de crianças foram correlacionadas com a produção de LPS com propriedades

imunoinibitórias, podendo dar origem a uma resposta autoimune e contribuir com o desenvolvimento de diabetes do tipo I (VATANEN et al., 2016). Também demonstramos no Capítulo I que o uso de SXT em camundongos resulta em aumento da biossíntese de antígeno O.

Nossos dados sugerem que o processo de desnutrição infantil altera a microbiota intestinal de tal modo que a recuperação alimentar a curto prazo não é capaz de contornar seus efeitos. Portanto, a disbiose causada pela desnutrição não é reparada apenas com um curto prazo de recuperação alimentar. Esses resultados nos levaram a questionar se seria possível reestabelecer um perfil de microbiota saudável apenas com uma correta nutrição ao longo da vida. Então, buscamos identificar a composição e a funcionalidade da microbiota intestinal de camundongos C57BL/6 que passaram pela desnutrição na infância após um período de aproximadamente 20 semanas imediatamente ao final do protocolo de recuperação.

Quando analisamos o efeito da desnutrição infantil na composição da microbiota intestinal no período aproximadamente 20 semanas após o final do protocolo de recuperação, identificamos 7 taxa com diferenças entre os grupos UND e CON. A família Staphylococcaceae foi identificada em maior abundância em animais do grupo CON. Gupta et al. (2011) demonstrou que essa família se encontra em maior abundância em crianças saudáveis quando comparadas a crianças desnutridas, porém os dados obtidos não foram suficientes para inferir a família Staphylococcaceae como um marcador de perfil de microbiota saudável (GUPTA et al., 2011). Além disso, crianças com quadro de kwashiorkor também demonstraram redução na família Staphylococcaceae (TIDJANI ALOU et al., 2017). O gênero *Sutterella* também foi encontrado em maior abundância em camundongos CON quando comparados com os camundongos UND. *Sutterella* é usualmente associada a doenças como a obesidade, o autismo, a síndrome de Down e as doenças inflamatórias intestinais (BEZAWADA et al., 2020; BIAGI et al., 2014; LAVELLE et al., 2015; WANG et al., 2020a; WILLIAMS et al., 2012). Porém, Hiippala et al. (2016) demonstraram que esse gênero é amplamente prevalente em adultos saudáveis, além de possuir atividade pró-inflamatória moderada, não contribuindo para alterações na homeostase intestinal e não resulta em disbiose (HIIPPALA et al., 2016).

A ordem RF39, representante do filo Tenericutes, foi o único táxon presente no grupo UND com abundância significativamente maior quando comparado com o grupo CON. Lippert *et al.* (2017) correlacionaram negativamente a presença da ordem RF39 com indicadores clínicos de desordens metabólicas em idosos (LIPPERT *et al.*, 2017). A presença da ordem RF39 também foi associada com o consumo de dietas de consciência saudável (caracterizada pelo alto consumo de verduras, frutas, nozes, fermentados e grãos, além da redução de açúcares, carne vermelha, farinha branca, alimentos fritos e processados) quando comparadas com dietas ricas em gordura e açúcares em população sueca. Consequentemente, indivíduos com hábitos alimentares saudáveis apresentaram menor prevalência de casos de pré-diabetes (ERICSON *et al.*, 2020). Vale ressaltar que a ordem RF39 não foi o único táxon identificado colaborando para a redução de doenças metabólicas, mas sim uma sinergia entre RF39, *Lachnospira* e *Roseburia*. Entretanto, a abundância elevada da ordem RF39 também foi associada com crianças obesas quando comparados com grupos de crianças que apresentavam doença hepática gordurosa não alcoólica, esteatose hepática não alcoólica e com crianças saudáveis, sendo que esse último apresentou a menor abundância para a ordem RF39 (DEL CHIERICO *et al.*, 2017). Os resultados da literatura com relação a ordem RF39 ainda se mostram contraditórios, alguns estudos mostram sua relação com dietas saudáveis e redução de desordens metabólicas enquanto outros associam a sua presença com distúrbios metabólicos.

A análise de funcionalidade da microbiota de animais CON e UND após 20 semanas do protocolo de recuperação alimentar demonstra que os animais UND ainda apresentam alterações em diversas vias metabólicas. O grupo CON demonstrou maior presença da super via metabólica de biossíntese de L-triptofano quando comparado com o grupo UND. Alterações na microbiota intestinal em quadros de inflamação intestinal resultam no aumento da degradação e na inibição da biossíntese de L-triptofano (LIN *et al.*, 2021a). O triptofano é um aminoácido essencial precursor da serotonina (5-hidroxitriptamina – 5-HT), portanto baixos níveis de triptofano levam a baixos níveis de serotonina. Alterações na regulação de 5-HT foi correlacionada com a patogênese da inflamação intestinal, apresentando implicações em doenças inflamatórias intestinais e colite experimental (NI *et al.*, 2017). Além disso, redução na secreção de 5-HT está relacionada tanto ao desenvolvimento do sistema nervoso entérico e a motilidade intestinal,

como também a doenças do espectro autista, depressão e anorexia (KAŁUŻNA-CZAPLIŃSKA et al., 2019; LIN et al., 2021b). A depressão pode resultar no aumento da ingestão de alimentos levando a ganho de peso (MILANESCHI et al., 2019). Nossos dados indicam que a via de L-triptofano em animais UND não se encontra em abundância compatível com os animais CON, esse dado nos leva a acreditar em alterações nos níveis de serotonina em camundongos UND e no desenvolvimento de um quadro parecido com a depressão e, conseqüentemente, no aumento do peso nos animais machos.

Mesmo após a recuperação alimentar a longo prazo, os animais CON apresentem maior abundância de vias metabólicas relacionadas a biossíntese de metionina quando comparados com animais UND. Observamos principalmente uma maior abundância na via de biossíntese de S-adenosil L-metionina, a qual é negativamente associada com a ocorrência de diabetes do tipo 2 devido sua participação das enzimas que compõe a via na catalise de diversas reações químicas no organismo (AFOLAYAN et al., 2020; LANDGRAF; MCCARTHY; BOOKER, 2016). Entretanto, também observamos aumento da super via de biossíntese de L-aspartato e L-asparagina em camundongos UND. A presença de L-aspartato é capaz de limitar a progressão de esteatose hepática, enquanto a presença de asparagina no plasma é associada com baixo risco para diabetes do tipo 2 (HORNE et al., 2020; OTTOSSON et al., 2018; YANNI et al., 2010). O aumento da abundância da biossíntese de L-aspartato e L-asparagina podem indicar um recurso para amenizar as desordens metabólicas causadas pela redução da biossíntese de S-adenosil L-metionina em camundongos UND.

Já em camundongos UND, observamos abundância elevada de diversas vias relacionadas com a degradação de nucleotídeos quando comparados com camundongos CON. As vias de degradação de purina e guanósina resultam na produção de ácido úrico, o qual quando presente em altas concentrações está associada com desordem como artrite gotosa, doenças cardiovasculares e formação de pedras nos rins além de estar positivamente correlacionada com a obesidade (SATO et al., 2021b). A presença de ácido úrico em concentrações elevadas é associada com aumento de citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo (DI et al., 2018; SATO et al., 2021a; UCHIDA et al., 2018). Além disso, camundongos UND apresentam aumento na abundância de vias metabólicas relacionadas

com a fermentação de SCFAs quando comparados aos camundongos CON. A via de fermentação de L-lisina em acetato e butanoato também resulta na produção de amônia, contribuindo assim para o estabelecimento do quadro de uremia e possível rompimento da barreira epitelial no intestino (KREIMEYER et al., 2007).

A assimilação de formaldeído pela via RuMP também se encontra em abundância elevada em animais UND quando comparados com animais CON. Formaldeído é o mais simples dos aldeídos com alto nível de toxicidade, geralmente produzido por bactérias metanotróficas e metilotróficas, com exceção para algumas bactérias não-metilotróficas como *B. subtilis* e *Burkholderia cepacia*, a partir da oxidação de hidrocarbonetos de cadeia curta (CHEN et al., 2016; HUYEN et al., 2009). O sistema RuMP é utilizado por essas bactérias para identificar e detoxificar o formaldeído presente no lúmen intestinal (CHEN et al., 2016). Formaldeído é geralmente produzido por células do hospedeiro durante infecções bacterianas, além da liberação indireta pelo sistema imune durante a sua explosão respiratória que resulta em inflamação e peroxidação de lipídeos (CHEN et al., 2016). Esses dados podem indicar que camundongos UND favorecem a via RuMP de assimilação de formaldeído como mecanismo de detoxificação durante um possível estado de inflamação intestinal.

Já a super via de resgate de nucleosídeos de pirimidina pode resultar na presença de uridina, um nucleosídeo de pirimidina responsável pela regulação dos metabolismos de glicose e lipídeos (LIU et al., 2021). A suplementação alimentar de uridina em camundongos saudáveis resulta em indução de intolerância sistêmica a glicose, resultando em pré-diabetes, e a acumulação severa de lipídeos no fígado (URASAKI; PIZZORNO; LE, 2016). Nosso estudo demonstra que camundongos UND apresentam aumento da super via de resgate de nucleosídeos de pirimidina quando comparados com camundongos CON. Esses dados reforçam a hipótese de um estado metabólico alterado que favorece o estabelecimento de síndrome metabólica, resultando em esteatose hepática, diabetes e aumento de peso na vida adulta.

Outras vias alteradas em camundongos UND em relação aos CON foram as vias III e VI de biossíntese de L-lisina. Em pacientes com síndrome metabólica, os níveis de lisina em conjunto com a metionina se encontram reduzidos (REDDY; LEONG; JIALAL,

2018). A presença de lisina também está correlacionada negativamente com características cardio-metabólicas e alguns biomarcadores de inflamação, como IL-6 e TLR4 (REDDY; LEONG; JIALAL, 2018). Entretanto, a redução nos níveis de lisina parece estar associada com aumento de vias de degradação e não na redução da biossíntese, isso devido a presença de produtos da degradação como o aminoácido (IIDA et al., 2016). Entretanto, o aumento de lisina pode resultar no favorecimento de vias de acetilação da mesma, trazendo implicações para integridade de vias metabólicas e imunológicas, contribuindo para estados de resistência à insulina e obesidade (IYER; FAIRLIE; BROWN, 2012; REDDY; LEONG; JIALAL, 2018).

Nossos dados em relação aos efeitos da desnutrição em longo prazo sugerem que o quadro de desnutrição sofrido na infância influencia a biossíntese de alguns aminoácidos essenciais, a degradação de nucleotídeos e o resgate de nucleosídeos de tal modo que as alterações perduram até a vida adulta. Essas alterações estão, em sua maior parte, correlacionadas com o surgimento de síndromes metabólicas, resultando em diabetes, obesidade e esteatose hepática, embora não tenhamos observado o desenvolvimento de obesidade “espontânea” nos animais do grupo UND, mas poderia ser interessante submeter os mesmos a dietas indutoras de obesidade (MUJICO et al., 2013) e verificar se eles têm uma maior facilidade de desenvolver esse distúrbio.

O perfil da composição da microbiota intestinal levando em conta todos os quatro grupos (CON, VZV, UND, UND+VZV) analisados demonstrou diferenças significativas apenas em duas taxa: a ordem RF39 se encontra em maior abundância nos animais UND e a família Staphylococcaceae se mostra em maior abundância nos animais CON. Como discutido anteriormente, a literatura apresenta relatos antagônicos ao atribuir importância para a ordem RF39, a qual é associada tanto com a presença quanto a ausência de distúrbios metabólicos (DEL CHIERICO et al., 2017; ERICSON et al., 2020; LIPPERT et al., 2017). Além disso, a família Staphylococcaceae se mostra como um integrante comensal em perfis de microbiota saudável, sendo reduzido em casos de desnutrição (GUPTA et al., 2011; TIDJANI ALOU et al., 2017).

Assim como na análise entre UND e CON ao final das 20 semanas de experimento, os animais UND permanecem com aumento significativo na via de biossíntese de N10-

formil-tetrahidrofolato (também conhecida por via III de transformação de folato) levando os quatro grupos experimentais em consideração. O folato é um componente nutricional de extrema importância, envolvido em diversas vias metabólicas como as de replicação, reparação e metilação de DNA (O'CONNOR, 2013). Além disso, a síntese de folato está relacionada com a presença de gêneros na microbiota intestinal com propriedades probióticas, como os *Lactobacillus* e as *Bifidobacterium*, e capazes de modular a resposta imune (LEBLANC et al., 2013; POMPEI et al., 2007). Novamente notamos o favorecimento de vias responsáveis pela modulação do sistema imune como uma possível regulação da inflamação intestinal decorrente da desnutrição.

Já o grupo VZV demonstrou aumento da via II de degradação de nucleotídeos de purina quando comparados com os demais grupos. Essa via havia sido destacada anteriormente como geradora de ácido úrico no organismo, podendo resultar em síndrome metabólica. Com a comparação geral dos grupos, observamos que essa alteração não está presente apenas em animais UND, mas também em animais controles. Podemos então supor que essa não seja uma alteração a longo prazo da desnutrição, mas sim um desequilíbrio associado a idade dos animais.

Os animais UND+VZV foram os que apresentaram as maiores alterações na funcionalidade da microbiota intestinal. Observamos um aumento na abundância da via III de resgate de adenina e adenosina quando comparamos o grupo UND+VZV com os demais. Diversos microrganismos reciclam os nucleotídeos de adenosina através da via de degradação em conjunto com a via de resgate. A reparação de danos no epitélio e na camada mucosa intestinal necessita de grande geração de nucleotídeos com a finalidade de replicação de DNA e de geração de RNA para transcrição de proteínas (LEE et al., 2020). Além disso, a via de recuperação de adenina e adenosina resulta na formação de IMP (inosina monofosfato), o qual é utilizado na via de biossíntese de nucleotídeos para gerar AMP (adenosina monofosfato) que é consecutivamente fosforilado em ADP (adenosina difosfato) e ATP (adenosina trifosfato) (LEE et al., 2018). A regeneração do epitélio intestinal necessita de altas concentrações de ATP para sustentar o processo de geração de novas células além da produção e secreção de muco pelo retículo endoplasmático (LEE et al., 2018, 2020). Portanto, o aumento da via de resgate de adenina e adenosina nos animais

UND+VZV pode indicar um epitélio intestinal danificado ou com permissividade superior ao normal, o que justificaria a necessidade de maior concentração de nucleotídeos para a manutenção desse epitélio.

A via I de degradação de glicogênio também se encontra elevada em camundongos UND+VZV quando comparado com os demais grupos. As vias associadas ao metabolismo de glicogênio estão presentes em microrganismos capazes de sobreviver em ambientes diversos, proporcionando vantagens competitivas no trato gastrointestinal devido a utilização dessa fonte para sustentar uma rápida expansão (MILANI et al., 2015).

Portanto, nossos dados demonstram que, quando aumentamos o número de grupos experimentais, com a inclusão dos grupos VZV e UND+VZV, as diferenças estatísticas tanto de composição quanto de funcionalidade são “diluídas” entre as amostras. Ainda observamos algumas alterações referentes a síntese de vitaminas e nucleotídeos, além da degradação de polissacarídeos. Porém, identificamos que algumas vias analisadas anteriormente podem ser melhor associadas com a idade do animal do que com a desnutrição. Além disso, vale destacar que os animais CON não demonstraram abundância significativa em nenhuma das vias metabólicas analisadas. Entretanto, demonstramos que tanto os animais UND quando os animais UND+VZV apresentam alterações significativas tanto na composição quanto na funcionalidade da microbiota que podem resultar em disbiose e, conseqüentemente, em alteração na indução relação com o sistema imune do hospedeiro.

Após a identificação dos perfis da microbiota intestinal a curto e a longo prazo de animais que passaram por período de desnutrição durante a infância, buscamos determinar se as alterações observadas na composição e na funcionalidade da microbiota eram capazes de influenciar o sistema imune. Para isso, caracterizamos a resposta imune em relação ao perfil de células B no período correspondente ao final do protocolo de recuperação, concomitantemente ao início da vacinação dos animais.

Células B são marcadores da intensidade da interação entre a imunidade de mucosa e a microbiota (MILLION et al., 2018). Desde o nascimento, a microbiota intestinal interage com o sistema imune, impactando a geração, a ativação, a proliferação e a funcionalidade das células B (HANSSON et al., 2011). Além disso, aumento no índice de

IgA fecal (razão entre bactérias recobertas por IgA e o total de bactérias) é observado em casos de doença do intestino irritado associada a disbiose intestinal (PALM et al., 2014). Esse aumento no índice de IgA é relacionado com a maior permeabilidade da barreira de muco e do epitélio intestinal, o que favorece a interação da microbiota com a células do epitélio e com células do sistema imune de mucosas (BUNKER et al., 2015; PELASEYED et al., 2014). Mesmo nosso estudo não tendo avaliado a produção de IgA, o aumento observado na população de células B maduras (B220+) pode estar associado com o quadro de disbiose causado pela desnutrição e um possível quadro inflamatório no trato gastrointestinal. Essa teoria está de acordo com o perfil de composição e de funcionalidade da microbiota que encontramos ao final do período de recuperação alimentar, no qual o grupo UND apresentou tanto redução de gêneros associados com o processo de modulação da resposta inflamatória quanto alterações funcionais associadas com a quebra da barreira de mucosa, como a redução da via de degradação de fucose e o aumento do ciclo da ureia, e a translocação microbiana, como o aumento da biossíntese de antígeno O.

Nosso estudo também demonstrou que os animais UND apresentam a manutenção do número de células B de centro germinativo. Esses dados se correlacionam a outro estudo que demonstrou que células B de centros germinativos tendem a ser mais resistentes a períodos de desnutrição do que as outras células linfáticas (RHO et al., 2017). Vale notar que as células B de centros germinativos necessitam da sinalização de células T CD4+ foliculares para diferenciação em células plasmáticas de vida longa (BUNKER et al., 2015). Palm *et al.* (2014) demonstrou que, em modelos murinos de colite, as respostas de células B produtoras de IgA eram principalmente dependentes de células T, indicando que a presença de disbiose na microbiota intestinal favorece a resposta de células B através da indução de respostas T-dependentes após a identificação de componentes comensais. Nosso estudo mostra que a desnutrição na infância resulta num aumento nas populações de células B maduras, células B precursoras de memória, células B de memória e células B foliculares. Ou seja, existiriam alterações de diferentes tipos no compartimento dos linfócitos B. O aumento observado nas populações de células B sugere que a desnutrição resultou em um quadro de disbiose da microbiota intestinal que por sua vez pode influenciar no desenvolvimento de diferentes populações de células.

Rho *et al.* (2017) ainda demonstrou em modelo murino de desnutrição proteico-energética alterações no status de desenvolvimento de células B na medula óssea, além do aumento na frequência de células B secretoras de IgA e do aumento da secreção de IgA por células plasmáticas na lâmina própria do intestino delgado. Essas alterações implicaram em diminuição da eficácia de proteção para vacina oral de cólera e para vacina atenuada recombinante de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Já Sakai *et al.* (2006) demonstrou que a desnutrição em camundongos C57BL/6 foi capaz de reduzir as células T CD8⁺ ovalbumina-específicas e a produção de IL-2 por células T CD4⁺ após imunização com vacina de DNA anti-ovalbumina, porém a resposta de anticorpos específicos contra a ovalbumina se manteve inalterada, sugerindo a manutenção da resposta de células B após a desnutrição (SAKAI *et al.*, 2006). Entretanto, estudo avaliando a desnutrição infantil em ratos durante o período de aleitamento demonstrou redução nos precursores das células B, entre eles as células B foliculares, na medula óssea e nos linfonodos mesentéricos e redução de células B secretoras de IgA (FLÓ *et al.*, 1996).

Com relação a microbiota intestinal e o imunometabolismo, observamos uma redução em vias que resultam na fermentação de SCFA em animais UND ao final do período de recuperação alimentar. O metabolismo de SCFA é uma importante fonte de energia para as células e é de extrema importância durante processos que exigem grande gasto energético, como a diferenciação de células B em células plasmáticas e a produção de anticorpos (MICHAUDEL; SOKOL, 2020). Os SCFA são convertidos em acetil-CoA e integrados no ciclo do ácido cítrico mitocondrial, resultando em ATP. O acetil-CoA derivado de SCFA pode ser utilizado também como substrato na síntese de ácidos graxos, os quais estão envolvidos na diferenciação para células plasmáticas e para a produção e troca de classe de anticorpos (GUO *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2016; MICHAUDEL; SOKOL, 2020). Além disso, SCFA é responsável pela estimulação da glicólise em células B através da ativação de mTOR (*mammalian target of rapamycin* – alvo da rapamicina em mamíferos) (KIM *et al.*, 2016). Kim *et al.* (2016) demonstraram que a redução de SCFA em camundongos com déficit nutricional apresentam defeitos na homeostase da resposta imune e na resposta de anticorpos patógeno-específica, resultando no aumento da susceptibilidade a infecções por patógenos.

Observa-se também uma maior abundância da via de degradação de glicogênio em animais UND ao final do período de recuperação alimentar e nos animais UND+VZV a longo prazo. O glicogênio, além de atuar como fonte de reserva de carbono e energia, vem sendo relacionado com atividades imunoestimulantes (BESFORD; CAVALIERI; CARUSO, 2020b; YASUDA et al., 2013). A presença de glicogênio no lúmen intestinal resulta em estímulo da resposta de macrófagos, da resposta antitumoral e da diferenciação de células Caco-2, modelo experimental da barreira intestinal (BESFORD; CAVALIERI; CARUSO, 2020a). Devido as diversas propriedades imunoestimulatórias dessa nanopartícula natural, o glicogênio vem recebendo grande interesse como possível imunomodulador e adjuvante vacinal (KAJIURA et al., 2010; LU et al., 2015). Portanto, o aumento da via de degradação de glicogênio pela microbiota de camundongos UND pode resultar em redução das concentrações dessa molécula no lúmen intestinal, diminuindo assim sua ação no sistema imune e reduzindo atuação como adjuvante durante a imunização com a vacina anti-varicela-zoster. Já a redução de glicogênio durante a vida adulta de camundongos UND+VZV pode também influenciar na modulação da resposta imune contra uma possível infecção por varicela-zoster, uma vez que a eficácia da vacina pode ter sido comprometida durante a infância devido as alterações decorrentes da desnutrição.

Além disso, a super via metabólica de biossíntese de L-triptofano foi encontrada em maior abundância em animais CON após 20 semanas do protocolo de desnutrição. Como descrito anteriormente, o triptofano é um aminoácido essencial precursor da serotonina. A presença de butirato é capaz de encaminhar o triptofano para a via da serotonina, resultando na produção de ácido 5-hidroxi indol-3-acético (5-HIAA). 5-HIAA atua na ativação do receptor aril-hidrocarboneto (AhR), responsável pela indução da funcionalidade de células B regulatórias (Bregs) (ROSSER et al., 2020). As células Bregs são células B imunossupressoras produtoras de IL-10 e responsáveis pela tolerância à microbiota intestinal e pela atenuação da resposta inflamatória intestinal, através da inibição de células B de centros germinativos e da diferenciação plasmablastos (MICHAUDEL; SOKOL, 2020; SATTLER et al., 2014). As células Bregs estão associadas com a manutenção da homeostase da resposta imune, suprimindo diversas patologias associadas a imunidade pela produção de citocinas anti-inflamatórias, além de promover a

diferenciação de células T regulatórias e a inibição da expansão de células T patogênicas e de linfócitos pró-inflamatórios (CARTER et al., 2011; ROSSER et al., 2020). A maior abundância da via de biossíntese de L-triptofano nos nossos animais CON nos leva a teorizar uma possível manutenção da homeostase intestinal através da ativação das células Bregs. Camundongos CON seriam capazes de suprimir um ambiente inflamatório e promover um controle da microbiota intestinal por meio de células Bregs, enquanto camundongos UND e UND+VZV careceriam dessa regulação, favorecendo o estabelecimento de um perfil de disbiose e de inflamação intestinal.

A partir dos dados relatados na literatura e dos nossos resultados, podemos teorizar que a desnutrição gera um quadro de disbiose na microbiota intestinal, resultando na redução da camada de mucosa e na quebra da barreira epitelial e permitindo a translocação de microrganismos comensais, os quais induzem a geração de uma resposta imune e favorecem a expansão de subtipos de células B tanto a nível sistêmico quanto de mucosa intestinal. Entretanto, de acordo com a redução na abundância de certas vias metabólicas em animais UND, podemos sugerir que, mesmo com a expansão celular, a funcionalidade dessas células pode estar comprometida, o que poderia explicar indiretamente o aumento no número de células B, como forma de suprir a deficiência funcional. Além disso, alterações em vias metabólicas a longo prazo indicam uma possível redução de células regulatórias, o que favoreceria ainda mais a disbiose e prováveis processos inflamatórios intestinais.

Em síntese, nossos resultados demonstraram que:

A hipótese foi confirmada ao longo da tese, na qual demonstrou-se que a desnutrição alterou tanto o perfil da microbiota intestinal quanto das funções metabólicas exercidas por essa comunidade microbiana. Além disso, demonstrou-se que as alterações de composição da microbiota e de suas funções metabólicas persistiram mesmo após a recuperação alimentar a longo prazo, resultando em implicações na vida adulta.

Como objetivo geral, determinou-se que a desnutrição durante a infância resultou na alteração do perfil microbiano em 7 taxa e da funcionalidade metabólica em 25 vias durante a vida adulta de camundongos C57BL/6.

Em relação ao objetivo específico 1 demonstramos que, no auge da desnutrição, os animais UND apresentam diferenças na composição da microbiota intestinal, resultando em alterações a nível de filo, nas quais destacamos o aumento de Bacteroidetes e redução de Firmicutes e Deferribacteres. Já a análise da recuperação alimentar em curto prazo demonstrou que a composição da microbiota intestinal ainda apresenta alterações em animais UND, com aumento significativo do filo Verrucomicrobia, com um total de 13 taxa com alterações significativas. Entretanto, a recuperação alimentar a longo prazo restaura as diferenças na composição da microbiota intestinal dos animais CON e UND, demonstrando alterações significativas em apenas 7 taxa. Quando incluímos os grupos VZV e UND+VZV na avaliação a microbiota a longo prazo, demonstramos que apenas 2 taxa alteradas. Demonstramos também que a profilaxia com SXT associada a desnutrição, como recomendado pela OMS, altera a composição da comunidade bacteriana, com alterações na presença de 16 taxa.

Em relação ao objetivo específico 2 comprovamos que, no pico da desnutrição, os animais UND apresentaram alterações em 15 vias metabólicas, com aumento de vias relacionadas, principalmente, com a biossíntese de vitaminas e a degradação de carboidratos, polissacarídeos e nucleotídeos. Já a análise da recuperação alimentar em curto prazo apresentou alterações em 36 vias metabólicas, sendo que os animais UND demonstraram aumento, principalmente, de vias de metabolismo de componentes inorgânicos, geração de metabolitos/energia e biossíntese de açúcar nucleotídeo. Os efeitos a longo prazo da desnutrição demonstraram alterações em 25 vias metabólicas, sendo elas associadas com a degradação de nucleotídeos e de polissacarídeos, além da fermentação de SCFA e da biossíntese de nucleotídeos e aminoácidos. Com a inclusão dos grupos VZV e UND+VZV na avaliação a microbiota a longo prazo, demonstramos alterações em 11 vias metabólicas. Animais UND+SXT apresentaram alterações em 4 vias metabólicas durante o ápice da desnutrição, com aumento da via de síntese de aminoácidos e redução de vias de síntese de cofatores enzimáticos e metabolismo de componentes enxofre e nitrogênio.

Em relação ao objetivo específico 3, demonstramos que o uso do cotrimoxazol no modelo empregado, tal qual é preconizado pela OMS no tratamento da desnutrição em

crianças, resulta em alterações da microbiota tanto em composição como em funcionalidade metabólica, sendo que essa disbiose pode ter implicações futuras para o hospedeiro.

Em relação ao objetivo específico 4, observamos que a desnutrição resulta em disbiose da microbiota intestinal e altera o compartimento de células B a curto prazo, elevando as populações de linfócitos B maduros, de memória, precursoras de memória e foliculares.

7. CONCLUSÕES

1. Camundongos que sofreram desnutrição na infância apresentam alterações da microbiota intestinal em composição e funcionalidade metabólica que podem ser observadas a curto, médio e longo prazo.

2. Camundongos que sofreram desnutrição na infância e se recuperaram morfológicamente, apresentam alterações no número e frequência de diversas populações de células B entre a 6 e 8 semanas de vida.

3. A hipótese resultou verdadeira.

8. PERSPECTIVAS

O presente estudo abriu caminhos para novas questões a serem avaliadas no futuro. Pretendemos avaliar a influência da desnutrição e suas repercussões na composição e funcionalidade da microbiota intestinal entre e intra gêneros.

Coletamos amostras que vão nos permitir avaliar a resposta imune específica anti-varicela-zoster e correlacionar esses dados com as alterações na microbiota intestinal.

Além disso, gostaríamos de avaliar o uso profilático de SXT durante a desnutrição e correlacionar com a resposta imune.

9. REFERÊNCIAS

- ABE, M. et al. Defective antigen-presenting capacity of murine dendritic cells during starvation. **Nutrition**, v. 19, n. 3, p. 265–269, mar. 2003.
- ABENDROTH, A. et al. Varicella-Zoster Virus Infection of Human Dendritic Cells and Transmission to T Cells: Implications for Virus Dissemination in the Host. **Journal of Virology**, v. 75, n. 13, p. 6183–6192, 1 jul. 2001.
- AFOLAYAN, A. O. et al. Insights into the gut microbiota of Nigerian elderly with type 2 diabetes and non-diabetic elderly persons. **Heliyon**, v. 6, n. 5, p. e03971, 2020.
- AHMAD, A. et al. Analysis of gut microbiota of obese individuals with type 2 diabetes and healthy individuals. **PLoS ONE**, v. 14, n. 12, p. 1–15, 2019.
- AL-RASHIDI, H. E. Gut microbiota and immunity relevance in eubiosis and dysbiosis. **Saudi Journal of Biological Sciences**, n. xxxx, out. 2021.
- ALCOBA, G. et al. Do Children with Uncomplicated Severe Acute Malnutrition Need Antibiotics? A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2013.
- ALI, A.; IQBAL, N. T.; SADIQ, K. Environmental enteropathy. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 32, n. 1, p. 12–17, jan. 2016.
- ANDERSON, M. J.; WALSH, D. C. I. PERMANOVA, ANOSIM, and the Mantel test in the face of heterogeneous dispersions: What null hypothesis are you testing? **Ecological Monographs**, v. 83, n. 4, p. 557–574, nov. 2013.
- ANGELAKIS, E. et al. A metagenomic investigation of the duodenal microbiota reveals links with obesity. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–15, 2015.
- ANTUNES, K. H. et al. Microbiota-derived acetate protects against respiratory syncytial virus infection through a GPR43-type 1 interferon response. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–17, 2019.
- ARMAH, G. E. et al. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus

gastroenteritis in infants in developing countries in sub-Saharan Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 376, n. 9741, p. 606–614, ago. 2010.

ARVIN, A. Varicella-zoster virus: molecular virology and virus–host interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 442–449, 1 ago. 2001.

ARVIN, A. M. et al. Early immune response in healthy and immunocompromised subjects with primary varicella-zoster virus infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 3, p. 422–429, 1986a.

ARVIN, A. M. et al. Early Immune Response in Healthy and Immunocompromised Subjects with Primary Varicella-Zoster Virus Infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 3, p. 422–429, 1 set. 1986b.

ARVIN, A. M.; GERSHON, A. A. Live Attenuated Varicella Vaccine. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 59–100, 1996.

AZAD, M. B. et al. Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. **Canadian Medical Association Journal**, v. 185, n. 5, p. 385–394, 19 mar. 2013.

BABIREKERE-IRISO, E.; MUSOKE, P.; KEKITIINWA, A. Bacteraemia in severely malnourished children in an HIV-endemic setting. **Annals of Tropical Paediatrics**, v. 26, n. 4, p. 319–328, 2006.

BÄCKHED, F. et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. **Cell Host and Microbe**, v. 17, n. 5, p. 690–703, 2015.

BADR, G. et al. T lymphocytes from malnourished infants are short-lived and dysfunctional cells. **Immunobiology**, v. 216, n. 3, p. 309–315, mar. 2011.

BAJAJ, J. S. et al. Colonic mucosal microbiome differs from stool microbiome in cirrhosis and hepatic encephalopathy and is linked to cognition and inflammation. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 303, n. 6, p. G675–G685, 15 set. 2012.

BARIS, S. et al. Severe Early-Onset Combined Immunodeficiency due to Heterozygous Gain-of-Function Mutations in STAT1. **Journal of Clinical Immunology**, v. 36, n. 7, p. 641–648, 5 out. 2016.

BECATTINI, S.; TAUR, Y.; PAMER, E. G. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 6, p. 458–478, 2016.

BENGTSSON, B.; GREKO, C. Antibiotic resistance—consequences for animal health, welfare, and food production. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 119, n. 2, p. 96–102, 28 maio 2014.

BERKLEY, J. A. et al. Bacteremia among Children Admitted to a Rural Hospital in Kenya. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 1, p. 39–47, 2005.

BERKLEY, J. A. et al. Daily co-trimoxazole prophylaxis to prevent mortality in children with complicated severe acute malnutrition: A multicentre, double-blind, randomised placebo-controlled trial. **The Lancet Global Health**, v. 4, n. 7, p. e464–e473, 2016.

BERTOLO, R. F. P. et al. Arginine, ornithine, and proline interconversion is dependent on small intestinal metabolism in neonatal pigs. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 284, n. 5 47-5, p. 915–922, 2003.

BESFORD, Q. A.; CAVALIERI, F.; CARUSO, F. Glycogen as a Building Block for Advanced Biological Materials. **Advanced Materials**, v. 32, n. 18, p. 1904625, maio 2020a.

BESFORD, Q. A.; CAVALIERI, F.; CARUSO, F. Glycogen as a Building Block for Advanced Biological Materials. **Advanced Materials**, v. 32, n. 18, p. 1904625, 16 maio 2020b.

BEZAWADA, N. et al. Autism Spectrum Disorder and the Gut Microbiota in Children: A Systematic Review. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 76, n. 1, p. 16–29, 2020.

BHUTTA, Z. A. et al. What works? Interventions for maternal and child undernutrition and survival. **The Lancet**, v. 371, n. 9610, p. 417–440, fev. 2008.

BIAGI, E. et al. Gut Microbiome in Down Syndrome. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e112023, 11 nov. 2014.

BIRD, J. J. et al. Helper T Cell Differentiation Is Controlled by the Cell Cycle. **Immunity**, v. 9, n. 2, p. 229–237, ago. 1998.

BJERSING, J. L. et al. Loss of ileal IgA+ plasma cells and of CD4+ lymphocytes in ileal Peyer's patches of vitamin A deficient rats. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 130, n. 3, p. 404–408, dez. 2002.

BLACK, R. E. et al. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. **The Lancet**, v. 382, n. 9890, p. 427–451, ago. 2013.

BLANTON, L. V. et al. Gut bacteria that prevent growth impairments transmitted by microbiota from malnourished children. **Science**, v. 351, n. 6275, p. aad3311–aad3311, 2016.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 1 ago. 2014.

BOLYEN, E. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852–857, 24 ago. 2019.

BOTTING, K. et al. Early origins of heart disease: Low birth weight and determinants of cardiomyocyte endowment. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 39, n. 9, p. 814–823, set. 2012.

BOURKE, C. D. et al. Cotrimoxazole reduces systemic inflammation in HIV infection by altering the gut microbiome and immune activation. **Science Translational Medicine**, v. 11, n. 486, p. 1–14, 3 abr. 2019.

BRANDL, K. et al. Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. **Nature**, v. 455, n. 7214, p. 804–807, 24 out. 2008.

BRICHARD, B. et al. Intracellular cytokine profile of cord and adult blood monocytes.

Bone Marrow Transplantation, v. 27, n. 10, p. 1081–1086, 6 maio 2001.

BRIEND, A.; KHARA, T.; DOLAN, C. Wasting and stunting-similarities and differences: Policy and programmatic implications. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 36, n. 1, p. S15–S23, 2015.

BROWN, E. M. et al. Diet and specific microbial exposure trigger features of environmental enteropathy in a novel murine model. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 7806, 4 nov. 2015.

BRUBAKER, J. O. et al. Mitogenic activity of purified capsular polysaccharide A from *Bacteroides fragilis*: differential stimulatory effect on mouse and rat lymphocytes in vitro. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 162, n. 4, p. 2235–42, 1999.

BUNKER, J. J. et al. Innate and Adaptive Humoral Responses Coat Distinct Commensal Bacteria with Immunoglobulin A. **Immunity**, v. 43, n. 3, p. 541–553, 2015.

BWAKURA-DANGAREMBIZI, M. et al. A Randomized Trial of Prolonged Co-trimoxazole in HIV-Infected Children in Africa. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 1, p. 41–53, 2014.

CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016.

CAMPBELL, D. I. et al. Chronic T Cell-Mediated Enteropathy in Rural West African Children: Relationship with Nutritional Status and Small Bowel Function. **Pediatric Research**, v. 54, n. 3, p. 306–311, set. 2003.

CARTER, N. A. et al. Mice Lacking Endogenous IL-10–Producing Regulatory B Cells Develop Exacerbated Disease and Present with an Increased Frequency of Th1/Th17 but a Decrease in Regulatory T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 10, p. 5569–5579, 2011.

CHALMERS, I. M. et al. Intracellular cytokine profile of cord and adult blood lymphocytes. **Blood**, v. 92, n. 1, p. 11–8, 1 jul. 1998.

CHARBONNEAU, M. R. et al. Sialylated Milk Oligosaccharides Promote Microbiota-Dependent Growth in Models of Infant Undernutrition. **Cell**, v. 164, n. 5, p. 859–871, fev. 2016.

CHEN, B. DI et al. An Autoimmunogenic and Proinflammatory Profile Defined by the Gut Microbiota of Patients With Untreated Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis and Rheumatology**, v. 73, n. 2, p. 232–243, 2021.

CHEN, N. H. et al. Formaldehyde stress responses in bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAR, p. 1–17, 2016.

CHERRINGTON, C. A. et al. Organic Acids: Chemistry, Antibacterial Activity and Practical Applications. **Advances in Microbial Physiology**, v. 32, n. C, p. 87–108, 1991.

CHINTU, C. et al. Co-trimoxazole as prophylaxis against opportunistic infections in HIV-infected Zambian children (CHAP): A double-blind randomised placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 364, n. 9448, p. 1865–1871, 2004.

CHIU, S. S.; LAU, Y.-L. Review of the Varilrix™ varicella vaccine. **Expert Review of Vaccines**, v. 4, n. 5, p. 629–643, 9 out. 2005.

CHO, I. et al. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. **Nature**, v. 488, n. 7413, p. 621–626, 2012.

CHOO, J. M. et al. Divergent Relationships between Fecal Microbiota and Metabolome following Distinct Antibiotic-Induced Disruptions. **mSphere**, v. 2, n. 1, p. 1–16, 2017.

CHOW, W. L.; LEE, Y. K. Free fucose is a danger signal to human intestinal epithelial cells. **British Journal of Nutrition**, v. 99, n. 3, p. 449–454, 2008.

COHEN, J. I. Infection of Cells with Varicella-Zoster Virus Down-Regulates Surface Expression of Class I Major Histocompatibility Complex Antigens. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 5, p. 1390–1393, 1998.

COOK, M. L.; STEVENS, J. G. Replication of varicella-zoster virus in cell culture: An

ultrastructural study. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 32, n. 3–4, p. 334–350, ago. 1970.

CORWARE, K. et al. Protein energy malnutrition increases arginase activity in monocytes and macrophages. **Nutrition & Metabolism**, v. 11, n. 1, p. 51, 2014.

D'SOUZA, A. W. et al. Cotrimoxazole Prophylaxis Increases Resistance Gene Prevalence and α -Diversity but Decreases β -Diversity in the Gut Microbiome of Human Immunodeficiency Virus–Exposed, Uninfected Infants. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 11, p. 2858–2868, dez. 2020.

DAVRANDI, M. et al. The relationship between mucosal microbiota, colitis and systemic inflammation in Chronic Granulomatous Disorder Institute of Immunity and Transplantation, University College London, Royal Free Campus, Pond Street, London, NW3 2QG, United Kingdom D. **bioRxiv**, 2021.

DE LA COCHETIÈRE, M. F. et al. Effect of antibiotic therapy on human fecal microbiota and the relation to the development of *Clostridium difficile*. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 3, p. 395–402, 2008.

DE REPENTIGNY, L. et al. Characterization of binding of *Candida albicans* to small intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3172–3179, 2000.

DEL CHIERICO, F. et al. Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach. **Hepatology**, v. 65, n. 2, p. 451–464, 2017.

DESANTIS, T. Z. et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5069–5072, 2006.

DETHLEFSEN, L. et al. The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. **PLoS Biology**, v. 6, n. 11, p. e280, 18 nov. 2008.

DEVELOPMENT INITIATIVES. **Global Nutrition Report**. [s.l: s.n.].

DEWEY, K. G.; ADU-AFARWUAH, S. Systematic review of the efficacy and effectiveness of complementary feeding interventions in developing countries. **Maternal & Child Nutrition**, v. 4, n. s1, p. 24–85, abr. 2008.

DEWEY, K. G.; BEGUM, K. Long-term consequences of stunting in early life. **Maternal and Child Nutrition**, v. 7, n. SUPPL. 3, p. 5–18, 2011.

DI, Y. et al. Elevated Interleukin 1 β and Interleukin 6 Levels in the Serum of Children with Hyperuricemia. **Journal of Clinical Rheumatology**, v. 24, n. 2, p. 65–69, 2018.

DING, R. XUE et al. Revisit gut microbiota and its impact on human health and disease. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 27, n. 3, p. 623–631, 2019.

DORRESTEIN, P. C.; MAZMANIAN, S. K.; KNIGHT, R. Finding the Missing Links among Metabolites, Microbes, and the Host. **Immunity**, v. 40, n. 6, p. 824–832, jun. 2014.

DOUGLAS, G. M. et al. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 6, p. 685–688, 1 jun. 2020.

DRISSI, F. et al. Comparative genomics analysis of *Lactobacillus* species associated with weight gain or weight protection. n. January, 2014.

DRITZ, S. S. et al. Effects of administration of antimicrobials in feed on growth rate and feed efficiency of pigs in multisite production systems. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 220, n. 11, p. 1690–1695, 2002.

DUNCAN, C. J. A.; HAMBLETON, S. Varicella zoster virus immunity: A primer. **Journal of Infection**, v. 71, n. S1, p. S47–S53, jun. 2015.

ELOE-FADROSH, E. A. et al. Impact of Oral Typhoid Vaccination on the Human Gut Microbiota and Correlations with *S. Typhi*-Specific Immunological Responses. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e62026, 24 abr. 2013.

ENGFER, M. B. et al. Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis

in the upper gastrointestinal tract. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 6, p. 1589–1596, 1 jun. 2000.

ERICSON, U. et al. A Health-Conscious Food Pattern Is Associated with Prediabetes and Gut Microbiota in the Malmö Offspring Study. **Journal of Nutrition**, v. 150, n. 4, p. 861–872, 2020.

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

FERGUSON, D. P. et al. Postnatal undernutrition alters adult female mouse cardiac structure and function leading to limited exercise capacity. **Journal of Physiology**, v. 597, n. 7, p. 1855–1872, 2019.

FERNANDEZ, M. F.; BORIS, S.; BARBES, C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 449–455, mar. 2003.

FERREIRA, R. B. R.; ANTUNES, L. C. M.; FINLAY, B. B. Should the Human Microbiome Be Considered When Developing Vaccines? **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 11, p. e1001190, 18 nov. 2010.

FISCHER, D. D. et al. Protein Malnutrition Alters Tryptophan and Angiotensin-Converting Enzyme 2 Homeostasis and Adaptive Immune Responses in Human Rotavirus-Infected Gnotobiotic Pigs with Human Infant Fecal Microbiota Transplant. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 24, n. 8, p. 1–12, 21 ago. 2017.

FISCHINGER, S. et al. Sex differences in vaccine-induced humoral immunity. **Seminars in Immunopathology**, v. 41, n. 2, p. 239–249, 2019.

FLÓ, J. et al. Reversible Effects on B and T Cells of the Gut-Associated Lymphoid Tissues in Rats Malnourished during Suckling: Impaired Induction of the Immune Response to Intra-Peyer Patches Immunization with Cholera Toxin. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 80, n. 2, p. 147–154, ago. 1996.

- FRIEDLAND, I. R. Bacteraemia in severely malnourished children. **Annals of Tropical Paediatrics**, v. 12, n. 4, p. 433–440, 1992.
- FUJIMURA, K. E.; LYNCH, S. V. Microbiota in allergy and asthma and the emerging relationship with the gut microbiome. **Cell Host and Microbe**, v. 17, n. 5, p. 592–602, 2015.
- FUJIO-VEJAR, S. et al. The gut microbiota of healthy Chilean subjects reveals a high abundance of the phylum Verrucomicrobia. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–11, 2017.
- FURUSAWA, Y. et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. **Nature**, v. 504, n. 7480, p. 446–450, 2013.
- GABORIAU-ROUTHIAU, V. et al. The Key Role of Segmented Filamentous Bacteria in the Coordinated Maturation of Gut Helper T Cell Responses. **Immunity**, v. 31, n. 4, p. 677–689, out. 2009.
- GALDEANO, C. M. et al. Impact of a probiotic fermented milk in the gut ecosystem and in the systemic immunity using a non-severe protein-energy-malnutrition model in mice. **BMC Gastroenterology**, v. 11, n. 1, p. 64, 26 dez. 2011.
- GEBRU, T. H.; MEKONEN, H. H.; KIROS, K. G. Undernutrition and associated factors among adult HIV/AIDS patients receiving antiretroviral therapy in eastern zone of Tigray, Northern Ethiopia: a cross-sectional study. **Archives of Public Health**, v. 78, n. 1, p. 1–8, 2020.
- GENTON, L.; CANI, P. D.; SCHRENZEL, J. Alterations of gut barrier and gut microbiota in food restriction, food deprivation and protein-energy wasting. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 3, p. 341–349, jun. 2015.
- GERMAN, J. B. et al. Human Milk Oligosaccharides: Evolution, Structures and Bioselectivity as Substrates for Intestinal Bacteria. In: **Personalized Nutrition for the Diverse Needs of Infants and Children**. Basel: KARGER, 2008. v. 58p. 205–222.

GHOSH, T. S. et al. Gut Microbiomes of Indian Children of Varying Nutritional Status. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95547, 24 abr. 2014.

GIANNAKOPOULOS, C. G. et al. The effect of salinomycin on health status and performance of sows and their litters: A dose titration study. **Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine**, v. 48, n. 5, p. 257–265, 2001.

GILMARTIN, A. A.; PETRI, W. A. Exploring the role of environmental enteropathy in malnutrition, infant development and oral vaccine response. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1671, p. 20140143, jun. 2015a.

GILMARTIN, A. A.; PETRI, W. A. Exploring the role of environmental enteropathy in malnutrition, infant development and oral vaccine response. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1671, p. 20140143, 19 jun. 2015b.

GONDOIS-REY, F. et al. R5 Variants of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Preferentially Infect CD62L- CD4+ T Cells and Are Potentially Resistant to Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. **Journal of Virology**, v. 80, n. 2, p. 854–865, 15 jan. 2006.

GOUGH, E. K. et al. The impact of antibiotics on growth in children in low and middle income countries: Systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **BMJ (Online)**, v. 348, n. April, p. 1–13, 2014.

GOUGH, E. K. et al. Linear growth faltering in infants is associated with *Acidaminococcus* sp. and community-level changes in gut microbiota. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 114, p. 125–126, 2016.

GRASSLY, N. C. New vaccine strategies to finish polio eradication. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. 864–865, ago. 2015.

GREEN, F.; HEYWORTH, B. Immunoglobulin-containing cells in jejunal mucosa of children with protein-energy malnutrition and gastroenteritis. **Archives of Disease in Childhood**, v. 55, n. 5, p. 380–383, 1 maio 1980.

GROVER, Z.; EE, L. C. Protein Energy Malnutrition. **Pediatric Clinics of North America**, v. 56, n. 5, p. 1055–1068, out. 2009.

GUO, C. et al. Depletion of microbiome-derived molecules in the host using Clostridium genetics. **Science**, v. 366, n. 6471, p. 1–15, 13 dez. 2019.

GUPTA, M. C.; URRUTIA, J. J. Effect of periodic antiascaris and anti giardia treatment on nutritional status of preschool children. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 36, n. 1, p. 79–86, 1 jul. 1982.

GUPTA, S. et al. Metagenome of the gut of a malnourished child. **Gut Pathogens**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2011.

GUZMAN, C. E. et al. A pioneer calf foetus microbiome. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.

HABERTHUR, K. et al. CD4 T Cell Immunity Is Critical for the Control of Simian Varicella Virus Infection in a Nonhuman Primate Model of VZV Infection. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 11, p. e1002367, 10 nov. 2011.

HABERTHUR, K.; MESSAOUDI, I. Animal Models of Varicella Zoster Virus Infection. **Pathogens**, v. 2, n. 2, p. 364–382, 13 maio 2013.

HAKANSSON, A.; MOLIN, G. Gut Microbiota and Inflammation. **Nutrients**, v. 3, n. 6, p. 637–682, 3 jun. 2011.

HANSEN, C. H. F. et al. Patterns of Early Gut Colonization Shape Future Immune Responses of the Host. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e34043, 27 mar. 2012.

HANSSON, J. et al. Influence of gut microbiota on mouse B2 B cell ontogeny and function. **Molecular Immunology**, v. 48, n. 9–10, p. 1091–1101, maio 2011.

HARNED, B. K. et al. THE PHARMACOLOGY OF DUOMYCIN. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 51, n. 2, p. 182–210, nov. 1948.

HASHIMOTO, T. et al. ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and

intestinal inflammation. **Nature**, v. 487, n. 7408, p. 477–481, 25 jul. 2012.

HIIPPALA, K. et al. Mucosal prevalence and interactions with the epithelium indicate commensalism of *Sutterella* spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. OCT, p. 1–13, 2016.

HIRATA, S. ICHIRO; KUNISAWA, J. Gut microbiome, metabolome, and allergic diseases. **Allergy International**, v. 66, n. 4, p. 523–528, 2017.

HIRSCHHORN, N. Can small daily doses of antibiotics prevent the cycle of diarrhea, malabsorption, and malnutrition in children? **The American journal of clinical nutrition**, v. 24, n. 7, p. 872–875, 1971.

HOOPER, L. V.; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1268–1273, 8 jun. 2012.

HORNE, R. G. et al. High fat-high fructose diet-induced changes in the gut microbiota associated with dyslipidemia in Syrian hamsters. **Nutrients**, v. 12, n. 11, p. 1–20, 2020.

HUCH, J. H. et al. Impact of Varicella-Zoster Virus on Dendritic Cell Subsets in Human Skin during Natural Infection. **Journal of Virology**, v. 84, n. 8, p. 4060–4072, 2010.

HUDA, M. N. et al. Stool microbiota and vaccine responses of infants. **Pediatrics**, v. 134, n. 2, p. e362-72, 2014.

HUGHES, S. M. et al. Dendritic Cell Anergy Results from Endotoxemia in Severe Malnutrition. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 4, p. 2818–2826, 15 ago. 2009.

HUYEN, N. T. T. et al. Genome-wide responses to carbonyl electrophiles in *Bacillus subtilis*: Control of the thiol-dependent formaldehyde dehydrogenase AdhA and cysteine proteinase YraA by the MerR-family regulator YraB (AdhR). **Molecular Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 876–894, 2009.

IANIRO, G.; TILG, H.; GASBARRINI, A. Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: Between good and evil. **Gut**, v. 65, n. 11, p. 1906–1915, 2016.

IBRAHIM, M. K. et al. Impact of Childhood Malnutrition on Host Defense and Infection.

Clinical Microbiology Reviews, v. 30, n. 4, p. 919–971, 2 out. 2017.

ICHINOHE, T. et al. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract in influenza A virus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 13, p. 5354–5359, 2011.

IGNACIO, A. et al. Role of the Microbiome in Intestinal Barrier Function and Immune Defense. In: **Microbiome and Metabolome in Diagnosis, Therapy, and other Strategic Applications**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 127–138.

IHEKWEAZU, F. D.; VERSALOVIC, J. Development of the Pediatric Gut Microbiome: Impact on Health and Disease. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 356, n. 5, p. 413–423, nov. 2018.

IIDA, M. et al. Profiling of plasma metabolites in postmenopausal women with metabolic syndrome. **Menopause**, v. 23, n. 7, p. 749–758, 2016.

ISAAC, S. et al. Short- and long-term effects of oral vancomycin on the human intestinal microbiota. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 1, p. 128–136, jan. 2017.

ITOH, T. et al. Inhibition of food-borne pathogenic bacteria by bacteriocins from *Lactobacillus gasseri*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 137–141, set. 1995.

IVANOV, I. I. et al. Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. **Cell**, v. 139, n. 3, p. 485–498, out. 2009.

IVANOV, I. I.; HONDA, K. Intestinal Commensal Microbes as Immune Modulators. **Cell Host & Microbe**, v. 12, n. 4, p. 496–508, 18 out. 2012.

IYER, A.; FAIRLIE, D. P.; BROWN, L. Lysine acetylation in obesity, diabetes and metabolic disease. **Immunology and Cell Biology**, v. 90, n. 1, p. 39–46, 2012.

IYER, S. S. et al. Protein Energy Malnutrition Impairs Homeostatic Proliferation of Memory CD8 T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 1, p. 77–84, 1 jan. 2012.

JERNBERG, C. et al. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the

- human intestinal microbiota. **The ISME Journal**, v. 1, p. 56–66, 2007.
- JIN, M. et al. Effects of peptidoglycan on the development of steatohepatitis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1865, n. 4, p. 158595, 2020.
- JONES, K. D. J.; BERKLEY, J. A. Severe acute malnutrition and infection. **Paediatrics and International Child Health**, v. 34, n. sup1, p. S1–S29, 5 dez. 2014.
- JUNQUEIRA, A. L. N. et al. Safety and immunogenicity of hepatitis B vaccine administered into ventrogluteal vs. anterolateral thigh sites in infants: A randomised controlled trial. **International Journal of Nursing Studies**, v. 47, n. 9, p. 1074–1079, 2010.
- JURA, E. et al. Varicella-zoster virus infections in children infected with human immunodeficiency virus. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 8, n. 9, p. 586–590, set. 1989.
- KAJIURA, H. et al. A New Method for in vitro Glycogen Synthesis, and the Structure and Properties of the Synthesized Glycogen. **Journal of Applied Glycoscience**, v. 57, n. 2, p. 105–111, 2010.
- KAŁUŻNA-CZAPLIŃSKA, J. et al. How important is tryptophan in human health? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 1, p. 72–88, 2019.
- KAPLAN, S. A.; COHEN, P. Review: The somatomedin hypothesis 2007: 50 Years later. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 12, p. 4529–4535, 2007.
- KATO-MORI, Y. et al. Fermentation Metabolites from *Lactobacillus gasseri* and *Propionibacterium freudenreichii* Exert Bacteriocidal Effects in Mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 6, p. 1460–1467, dez. 2010.
- KAU, A. L. et al. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 327–336, 15 jun. 2011.
- KEENAN, J. D. et al. Azithromycin to Reduce Childhood Mortality in Sub-Saharan Africa.

New England Journal of Medicine, v. 378, n. 17, p. 1583–1592, 2018.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 19, p. 10409–10414, 16 set. 1997.

KIM, M. et al. Gut Microbial Metabolites Fuel Host Antibody Responses. **Cell Host and Microbe**, v. 20, n. 2, p. 202–214, 2016.

KIMURA, I. et al. Maternal gut microbiota in pregnancy influences offspring metabolic phenotype in mice. **Science**, v. 367, n. 6481, 2020.

KLEIN, S. L.; FLANAGAN, K. L. Sex differences in immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 10, p. 626–638, 2016.

KNIP, M.; SILJANDER, H. The role of the intestinal microbiota in type 1 diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 3, p. 154–167, 2016.

KOENIG, J. E. et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. Supplement_1, p. 4578–4585, 15 mar. 2011.

KRAJMALNIK-BROWN, R. et al. Effects of Gut Microbes on Nutrient Absorption and Energy Regulation. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 27, n. 2, p. 201–214, 24 abr. 2012.

KREIMEYER, A. et al. Identification of the Last Unknown Genes in the Fermentation Pathway of Lysine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 10, p. 7191–7197, mar. 2007.

KRYCH, L. et al. Quantitatively Different, yet Qualitatively Alike: A Meta-Analysis of the Mouse Core Gut Microbiome with a View towards the Human Gut Microbiome. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e62578, 1 maio 2013.

KU, C.-C. et al. Varicella-Zoster Virus Pathogenesis and Immunobiology: New Concepts Emerging from Investigations with the SCIDhu Mouse Model. **Journal of Virology**, v. 79,

n. 5, p. 2651–2658, 2005a.

KU, C.-C. et al. Varicella-Zoster Virus Pathogenesis and Immunobiology: New Concepts Emerging from Investigations with the SCIDhu Mouse Model. **Journal of Virology**, v. 79, n. 5, p. 2651–2658, 1 mar. 2005b.

KU, C. C. et al. Varicella-zoster virus transfer to skin by T cells and modulation of viral replication by epidermal cell interferon- α . **Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 7, p. 917–925, 2004.

KUMAR, M. et al. Gut microbiota dysbiosis is associated with malnutrition and reduced plasma amino acid levels: Lessons from genome-scale metabolic modeling. **Metabolic Engineering**, v. 49, p. 128–142, 2018.

KUNISAWA, J. et al. A pivotal role of vitamin B9 in the maintenance of regulatory T cells in vitro and in vivo. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. 1–6, 2012.

KYRIAKIS, S. C. et al. The effect of virginiamycin on sow and litter performance. **Animal Production**, v. 55, n. 3, p. 431–436, 1992.

LAGOS, R. et al. Effect of small bowel bacterial overgrowth on the immunogenicity of single-dose live oral cholera vaccine CVD 103-HgR. **The Journal of infectious diseases**, v. 180, p. 1709–1712, 1999.

LANDGRAF, B. J.; MCCARTHY, E. L.; BOOKER, S. J. Radical S-Adenosylmethionine Enzymes in Human Health and Disease. **Annual Review of Biochemistry**, v. 85, n. April, p. 485–514, 2016.

LAVELLE, A. et al. Spatial variation of the colonic microbiota in patients with ulcerative colitis and control volunteers. **Gut**, v. 64, n. 10, p. 1553–1561, 2015.

LAZAR, V. et al. Aspects of gut microbiota and immune system interactions in infectious diseases, immunopathology, and cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. AUG, 2018.

LEBLANC, J. G. et al. Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota

perspective. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 160–168, 2013.

LEE, J. S. et al. Hypoxanthine is a checkpoint stress metabolite in colonic epithelial energy modulation and barrier function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 16, p. 6039–6051, abr. 2018.

LEE, J. S. et al. Microbiota-Sourced Purines Support Wound Healing and Mucous Barrier Function. **iScience**, v. 23, n. 6, p. 101226, jun. 2020.

LEVINE, M. M. Immunogenicity and efficacy of oral vaccines in developing countries: lessons from a live cholera vaccine. **BMC Biology**, v. 8, n. 1, p. 129, 4 dez. 2010.

LEVY, M. et al. Dysbiosis and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 4, p. 219–232, 2017.

LIN, R. et al. Chronic cereulide exposure causes intestinal inflammation and gut microbiota dysbiosis in mice. **Environmental Pollution**, v. 288, n. June, p. 117814, 2021a.

LIN, R. et al. Chronic cereulide exposure causes intestinal inflammation and gut microbiota dysbiosis in mice. **Environmental Pollution**, v. 288, n. June, p. 117814, 2021b.

LIPPERT, K. et al. Gut microbiota dysbiosis associated with glucose metabolism disorders and the metabolic syndrome in older adults. **Beneficial Microbes**, v. 8, n. 4, p. 545–556, 24 ago. 2017.

LIU, Y. et al. Uridine attenuates obesity, ameliorates hepatic lipid accumulation and modifies the gut microbiota composition in mice fed with a high-fat diet. **Food and Function**, v. 12, n. 4, p. 1829–1840, 2021.

LOPMAN, B. A. et al. Understanding reduced rotavirus vaccine efficacy in low socio-economic settings. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 5 dez. 2014.

LU, F. et al. Dendrimer-like alpha-d-glucan nanoparticles activate dendritic cells and are effective vaccine adjuvants. **Journal of Controlled Release**, v. 204, p. 51–59, 2015.

LYNN, D. J.; PULENDRAN, B. The potential of the microbiota to influence vaccine responses. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 103, n. 2, p. jlb.5MR0617-216R, 1 set. 2017.

MACFARLANE, G. T.; HAY, S.; GIBSON, G. R. Influence of mucin on glycosidase, protease and arylamidase activities of human gut bacteria grown in a 3-stage continuous culture system. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 407–417, 1989.

MADAN, J. C. et al. Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. **Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition**, v. 97, n. 6, 2012.

MAGWIRA, C. A.; TAYLOR, M. B. Composition of gut microbiota and its influence on the immunogenicity of oral rotavirus vaccines. **Vaccine**, v. 36, n. 24, p. 3427–3433, jun. 2018.

MAJO, F. et al. Formative Research on Hygiene Behaviors and Geophagy among Infants and Young Children and Implications of Exposure to Fecal Bacteria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 4, p. 709–716, 9 out. 2013.

MALAVIGE, G. N. et al. Varicella zoster virus glycoprotein E-specific CD4⁺ T cells show evidence of recent activation and effector differentiation, consistent with frequent exposure to replicative cycle antigens in healthy immune donors. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 152, n. 3, p. 522–531, 2008.

MANICHANH, C. et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. **Gut**, v. 55, n. 2, p. 205–11, 1 fev. 2006.

MARTINS, C. et al. Measles virus antibody responses in children randomly assigned to receive standard-titer Edmonston-Zagreb measles vaccine at 4.5 and 9 months of age, 9 months of age, or 9 and 18 months of age. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 5, p. 693–700, 2014.

MARTINSEN, T. C.; BERGH, K.; WALDUM, H. L. Gastric Juice: A Barrier Against

Infectious Diseases. **Basic Clinical Pharmacology Toxicology**, v. 96, n. 2, p. 94–102, fev. 2005.

MATSUDA, T. et al. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 15, p. 4261–4269, 2 ago. 1999.

MAZMANIAN, S. K. et al. An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. **Cell**, v. 122, n. 1, p. 107–118, jul. 2005.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61217, 22 abr. 2013.

MELLO, A. S. et al. Protein Malnutrition Alters Spleen Cell Proliferation and IL-2 and IL-10 Production by Affecting the STAT-1 and STAT-3 Balance. **Inflammation**, v. 37, n. 6, p. 2125–2138, 2 dez. 2014.

MÉNDEZ-SALAZAR, E. O. et al. Altered gut microbiota and compositional changes in firmicutes and proteobacteria in mexican undernourished and obese children. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. OCT, p. 1–11, 2018.

MICHAUDEL, C.; SOKOL, H. The Gut Microbiota at the Service of Immunometabolism. **Cell Metabolism**, v. 32, n. 4, p. 514–523, 2020.

MILANESCHI, Y. et al. Depression and obesity: evidence of shared biological mechanisms. **Molecular Psychiatry**, v. 24, n. 1, p. 18–33, 2019.

MILANI, C. et al. Bifidobacteria exhibit social behavior through carbohydrate resource sharing in the gut. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–14, 2015.

MILLION, M. et al. New insights in gut microbiota and mucosal immunity of the small intestine. **Human Microbiome Journal**, v. 7–8, n. January, p. 23–32, 2018.

MILLION, M.; DIALLO, A.; RAOULT, D. Gut microbiota and malnutrition. **Microbial Pathogenesis**, v. 106, p. 127–138, maio 2017.

MIYAZAKI, A. et al. Protein deficiency reduces efficacy of oral attenuated human rotavirus vaccine in a human infant fecal microbiota transplanted gnotobiotic pig model. **Vaccine**, v. 36, n. 42, p. 6270–6281, out. 2018.

MONDAL, D. et al. Contribution of Enteric Infection, Altered Intestinal Barrier Function, and Maternal Malnutrition to Infant Malnutrition in Bangladesh. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 2, p. 185–192, 15 jan. 2012.

MONIRA, S. et al. Gut Microbiota of Healthy and Malnourished Children in Bangladesh. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. NOV, p. 1–7, 2011.

MOORE, P. R. et al. USE OF SULFASUXIDINE, STREPTOTHRICIN, AND STREPTOMYCIN IN NUTRITIONAL STUDIES WITH THE CHICK. **Journal of Biological Chemistry**, v. 165, n. 2, p. 437–441, out. 1946.

MORGAN, N. V. et al. Mutation in the TCR α subunit constant gene (TRAC) leads to a human immunodeficiency disorder characterized by a lack of TCR $\alpha\beta$ ⁺ T cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 2, p. 695–702, 1 fev. 2011.

MORROW, G. et al. Varicella-Zoster Virus Productively Infects Mature Dendritic Cells and Alters Their Immune Function. **Journal of Virology**, v. 77, n. 8, p. 4950–4959, 15 abr. 2003.

MU, C.; ZHU, W. Antibiotic effects on gut microbiota, metabolism, and beyond. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 23–24, p. 9277–9285, 2019.

MUJICO, J. R. et al. Changes in gut microbiota due to supplemented fatty acids in diet-induced obese mice. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 4, p. 711–720, 2013.

MYERS, M. G.; DUER, H. L.; HAUSLER, C. K. Experimental Infection of Guinea Pigs with Varicella-Zoster Virus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 142, n. 3, p. 414–420, 1 set. 1980.

NAJERA, O. et al. Flow Cytometry Study of Lymphocyte Subsets in Malnourished and Well-Nourished Children with Bacterial Infections. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.

11, n. 3, p. 577–580, 1 maio 2004.

NÁJERA, O. et al. CD45RA and CD45RO isoforms in infected malnourished and infected well-nourished children. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 126, n. 3, p. 461–465, dez. 2001.

NÁJERA, O. et al. Effector T lymphocytes in well-nourished and malnourished infected children. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 148, n. 3, p. 501–506, 15 mar. 2007.

NEYESTANI, T. R.; WOODWARD, B. Blood Concentrations of Th2-Type Immunoglobulins are Selectively Increased in Weanling Mice Subjected to Acute Malnutrition. **Experimental Biology and Medicine**, v. 230, n. 2, p. 128–134, fev. 2005.

NI, J. et al. Gut microbiota and IBD: Causation or correlation? **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 10, p. 573–584, 2017.

NIIYA, T. et al. Impaired Dendritic Cell Function Resulting from Chronic Undernutrition Disrupts the Antigen-Specific Immune Response in Mice. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3, p. 671–675, 1 mar. 2007.

NÚÑEZ, I. N. et al. Effect of a probiotic fermented milk on the thymus in Balb/c mice under non-severe protein–energy malnutrition. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 3, p. 500–508, 14 ago. 2013.

O’CONNOR, E. M. The role of gut microbiota in nutritional status. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 16, n. 5, p. 509–516, set. 2013.

OGUNRINDE, E. et al. A Link Between Plasma Microbial Translocation, Microbiome, and Autoantibody Development in First-Degree Relatives of Systemic Lupus Erythematosus Patients. **Arthritis and Rheumatology**, v. 71, n. 11, p. 1858–1868, 2019.

ORGANIZATION, W. H. Management of severe malnutrition: a manual for physicians and other senior health workers. **World Health Organization**, 1999.

OTTOSSON, F. et al. Altered asparagine and glutamate homeostasis precede coronary

artery disease and type 2 diabetes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 103, n. 8, p. 3060–3069, 2018.

PALLEJA, A. et al. Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 11, p. 1255–1265, 2018.

PALM, N. W. et al. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. **Cell**, v. 158, n. 5, p. 1000–1010, 2014.

PALMER, C. et al. Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS Biology**, v. 5, n. 7, p. 1556–1573, 2007.

PAN, S.; CHEN, R. Metaproteomic analysis of human gut microbiome in digestive and metabolic diseases. In: **Advances in Clinical Chemistry**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2020. v. 97p. 1–12.

PANDA, S. et al. Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

PANEL., G. The cost of malnutrition. Why policy action is urgent. **Global Panel on Agriculture and Food Systems for Nutrition**, 2016.

PARK, D. E. et al. The differential impact of coadministered vaccines, geographic region, vaccine product and other covariates on pneumococcal conjugate vaccine immunogenicity. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 33, n. SUPPL. 2, p. 130–139, 2014.

PARK, J.-H. et al. Suppression of IL7R α Transcription by IL-7 and Other Prosurvival Cytokines. **Immunity**, v. 21, n. 2, p. 289–302, ago. 2004.

PARKER, E. P. K. et al. Causes of impaired oral vaccine efficacy in developing countries. **Future Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 97–118, 2018.

PEKMEZ, C. T.; DRAGSTED, L. O.; BRAHE, L. K. Gut microbiota alterations and dietary modulation in childhood malnutrition – The role of short chain fatty acids. **Clinical Nutrition**, v. 38, n. 2, p. 615–630, abr. 2019.

PELASEYED, T. et al. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system.

Immunological Reviews, v. 260, n. 1, p. 8–20, jul. 2014.

PENG, L. et al. Effects of butyrate on intestinal barrier function in a caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier. **Pediatric Research**, v. 61, n. 1, p. 37–41, 2007.

PEREZ-SCHAEL, I. et al. Efficacy of the Human Rotavirus Vaccine RIX4414 in Malnourished Children. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 4, p. 537–540, 15 ago. 2007.

PHAM, T. P. T. et al. Gut Microbiota Alteration is Characterized by a Proteobacteria and Fusobacteria Bloom in Kwashiorkor and a Bacteroidetes Paucity in Marasmus. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.

PLOTKIN, S. A. Correlates of protection induced by vaccination. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 7, p. 1055–1065, 2010.

POMPEI, A. et al. Administration of folate-producing bifidobacteria enhances folate status in wistar rats. **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 12, p. 2742–2746, 2007.

POP, M. et al. Diarrhea in young children from low-income countries leads to large-scale alterations in intestinal microbiota composition. **Genome Biology**, v. 15, n. 6, p. R76, 2014.

POSTERARO, B. et al. The link between genetic variation and variability in vaccine responses: Systematic review and meta-analyses. **Vaccine**, v. 32, n. 15, p. 1661–1669, 2014.

PREBLUD, S. R. Varicella: complications and costs. **Pediatrics**, v. 78, n. 4 Pt 2, p. 728–35, out. 1986.

PREIDIS, G. A. et al. Composition and function of the undernourished neonatal mouse intestinal microbiome. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 10, p. 1050–1057, 2015.

PRENDERGAST, A. J. et al. Stunting Is Characterized by Chronic Inflammation in

Zimbabwean Infants. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e86928, 18 fev. 2014.

PRENDERGAST, A.; KELLY, P. Enteropathies in the Developing World: Neglected Effects on Global Health. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 5, p. 756–763, 1 maio 2012.

PUVION-DUTILLEUL, F. et al. Effect of dehydrating agents on DNA organization in herpes viruses. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 35, n. 6, p. 635–645, 5 jun. 1987.

R CORE TEAM. **The R project for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing web-site**. Disponível em: <www.R-project.org>. Acesso em: 10 dez. 2021.

RAKOFF-NAHOUM, S. et al. Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. **Cell**, v. 118, n. 2, p. 229–241, jul. 2004.

RAMIREZ, J. et al. Antibiotics as Major Disruptors of Gut Microbiota. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. November, p. 1–10, 2020.

REDDY, P.; LEONG, J.; JIALAL, I. Amino acid levels in nascent metabolic syndrome: A contributor to the pro-inflammatory burden. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 32, n. 5, p. 465–469, 2018.

REDDY, V.; RAGHURAMULU, N.; BHASKARAM, C. Secretory IgA in protein-calorie malnutrition. **Archives of Disease in Childhood**, v. 51, n. 11, p. 871–874, 1976.

REICHARDT, N. et al. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. **ISME Journal**, v. 8, n. 6, p. 1323–1335, 2014.

RÉMY, V.; ZÖLLNER, Y.; HECKMANN, U. Vaccination: the cornerstone of an efficient healthcare system. **Journal of Market Access & Health Policy**, v. 3, n. 1, p. 27041, 2015.

RHO, S. et al. Protein energy malnutrition alters mucosal IgA responses and reduces mucosal vaccine efficacy in mice. **Immunology Letters**, v. 190, n. July 2016, p. 247–256,

out. 2017.

RIBEIRO, C. F. A. et al. Effects of Antibiotic Treatment on Gut Microbiota and How to Overcome Its Negative Impacts on Human Health. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 10, p. 2544–2559, out. 2020a.

RIBEIRO, C. F. A. et al. Effects of Antibiotic Treatment on Gut Microbiota and How to Overcome Its Negative Impacts on Human Health. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 10, p. 2544–2559, 9 out. 2020b.

ROBERTSON, R. C. et al. The Human Microbiome and Child Growth – First 1000 Days and Beyond. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 131–147, fev. 2019.

RODRIGUEZ, L. et al. Assessment by Flow Cytometry of Cytokine Production in Malnourished Children. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 12, n. 4, p. 502–507, 1 abr. 2005.

ROGNES, T. et al. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. **PeerJ**, v. 4, n. 10, p. e2584, 18 out. 2016.

ROSSER, E. C. et al. Microbiota-Derived Metabolites Suppress Arthritis by Amplifying Aryl-Hydrocarbon Receptor Activation in Regulatory B Cells. **Cell Metabolism**, v. 31, n. 4, p. 837- 851.e10, 2020.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 5, p. 313–323, maio 2009.

RYTTER, M. J. H. et al. The Immune System in Children with Malnutrition—A Systematic Review. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e105017, 25 ago. 2014.

SAKAI, T. et al. Protein Deficiency Impairs DNA Vaccine-Induced Antigen-Specific T Cell but Not B Cell Response in C57BL/6 Mice. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 52, n. 5, p. 376–382, 2006.

SASSON, S. C. et al. Increased Plasma Interleukin-7 Level Correlates with Decreased CD127 and Increased CD132 Extracellular Expression on T Cell Subsets in Patients with HIV-1 Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 4, p. 505–514, 15 fev. 2006.

SATO, K. et al. Obesity-Related Gut Microbiota Aggravates Alveolar Bone Destruction in Experimental Periodontitis through Elevation of Uric Acid. **mBio**, v. 12, n. 3, jun. 2021a.

SATO, K. et al. Obesity-Related Gut Microbiota Aggravates Alveolar Bone Destruction in Experimental Periodontitis through Elevation of Uric Acid. **mBio**, v. 12, n. 3, 29 jun. 2021b.

SATTLER, S. et al. IL-10-producing regulatory B cells induced by IL-33 (BregIL-33) effectively attenuate mucosal inflammatory responses in the gut. **Journal of Autoimmunity**, v. 50, p. 107–122, 2014.

SAÚDE, S. DE V. EM S. / M. DA. **Guia da vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasília - DF: Editora MS, 2009.

SBIRAKI, A. P. et al. Effects of chlortetracycline administration on the health status and performance of sows: Results of a field trial. **Journal of Swine Health and Production**, v. 11, n. 3, p. 117–126, 2003.

SCHILBACH, K. Cytotoxic minor histocompatibility antigen HA-1-specific CD8⁺ effector memory T cells: artificial APCs pave the way for clinical application by potent primary in vitro induction. **Blood**, v. 106, n. 1, p. 144–149, 15 mar. 2005.

SCHUB, D. et al. Altered phenotype and functionality of varicella zoster virus-specific cellular immunity in individuals with active infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 4, p. 600–612, 2015.

SCHWAB, C. et al. Trophic interactions of infant bifidobacteria and eubacterium hallii during L-fucose and fucosyllactose degradation. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 1–14, 2017.

SCHWARZER, M. et al. Lactobacillus plantarum strain maintains growth of infant mice

during chronic undernutrition. **Science**, v. 351, n. 6275, p. 854–857, 19 fev. 2016.

SCOTT, J. E.; DAVISON, A. J. The Complete DNA Sequence of Varicella-Zoster Virus. **Journal of General Virology**, v. 67, n. 9, p. 1759–1816, 1 set. 1986.

SCOTT, P. IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. **Science**, v. 260, n. 5107, p. 496–497, 23 abr. 1993.

SEGATA, N. et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. **Genome Biology**, v. 12, n. 6, p. R60, 2011.

SHI, Z. et al. Early life exposure to Chinese famine modifies the association between hypertension and cardiovascular disease. **Journal of Hypertension**, v. 36, n. 1, p. 54–60, jan. 2018.

SISVAN. **Relatórios de Acesso Público do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional**. Disponível em: <<https://sisaps.saude.gov.br/sisvan/relatoriopublico/index>>. Acesso em: 7 fev. 2022.

SMITH, K.; MCCOY, K. D.; MACPHERSON, A. J. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. **Seminars in Immunology**, v. 19, n. 2, p. 59–69, abr. 2007.

SMITH, M. I. et al. Gut Microbiomes of Malawian Twin Pairs Discordant for Kwashiorkor. **Science**, v. 339, n. 6119, p. 548–554, 1 fev. 2013.

SNELSON, M. et al. Long Term High Protein Diet Feeding Alters the Microbiome and Increases Intestinal Permeability, Systemic Inflammation and Kidney Injury in Mice. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 65, n. 8, p. 1–12, 2021.

SOKOL, H. et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 43, p. 16731–16736, 28 out. 2008.

STEEVELS, T. A. M. et al. Effector/memory T cells of the weanling mouse exhibit Type 2

cytokine polarization in vitro and in vivo in the advanced stages of acute energy deficit.

The Journal of Nutritional Biochemistry, v. 21, n. 6, p. 504–511, jun. 2010.

STOKSTAD, E. L. R.; JUKES, T. H. Further Observations on the “Animal Protein Factor”.

Experimental Biology and Medicine, v. 73, n. 3, p. 523–528, 1 mar. 1950.

SUBRAMANIAN, S. et al. Persistent gut microbiota immaturity in malnourished

Bangladeshi children. **Nature**, v. 510, n. 7505, p. 417–421, 4 jun. 2014.

SUZUKI, K. et al. Detection of Aerosolized Varicella-Zoster Virus DNA in Patients with

Localized Herpes Zoster. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 6, p. 1009–1012,

15 mar. 2004.

SZABO, S. J. et al. Molecular Mechanisms Regulating Th1 Immune Responses. **Annual**

Review of Immunology, v. 21, n. 1, p. 713–758, abr. 2003.

TAHAN, S. et al. A randomized double-blind clinical trial of the effect of non-absorbable

oral polymyxin on infants with severe infectious diarrhea. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 2, p. 209–219, 2007.

TANAKA, M.; NAKAYAMA, J. Development of the gut microbiota in infancy and its

impact on health in later life. **Allergy International**, v. 66, n. 4, p. 515–522, out. 2017.

TANEJA, V. Microbiome. In: **Principles of Gender-Specific Medicine**. [s.l.] Elsevier,

2017. p. 569–583.

TAYLOR, A. K. et al. Protein energy malnutrition decreases immunity and increases

susceptibility to influenza infection in mice. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 3, p.

501–510, 2013.

TIDJANI ALOU, M. et al. Gut Bacteria Missing in Severe Acute Malnutrition, Can We

Identify Potential Probiotics by Culturomics? **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAY, p.

1–17, 23 maio 2017.

TISDALE, M. J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**, v. 17, n. 5, p. 438–442, maio

2001.

TURNBAUGH, P. J. et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 480–484, 30 jan. 2009a.

TURNBAUGH, P. J. et al. The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. **Science Translational Medicine**, v. 1, n. 6, p. 1–19, 11 nov. 2009b.

TWITCHELL, E. L. et al. Modeling human enteric dysbiosis and rotavirus immunity in gnotobiotic pigs. **Gut Pathogens**, v. 8, n. 1, p. 51, 8 dez. 2016.

TZIANABOS, A. Role of T cells in abscess formation. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 92–96, 1 fev. 2002.

UCHIDA, S. et al. Time to Target Uric Acid to Retard Chronic Kidney Disease Progression. **Contributions to Nephrology**, v. 192, p. 56–68, 2018.

URASAKI, Y.; PIZZORNO, G.; LE, T. T. Chronic Uridine Administration Induces Fatty Liver and Pre-Diabetic Conditions in Mice. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2016.

VALDEZ, Y.; BROWN, E. M.; FINLAY, B. B. Influence of the microbiota on vaccine effectiveness. **Trends in Immunology**, v. 35, n. 11, p. 526–537, nov. 2014.

VATANEN, T. et al. Variation in Microbiome LPS Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans. **Cell**, v. 165, n. 4, p. 842–853, 2016.

VAZIRI, N. D. et al. Disintegration of colonic epithelial tight junction in uremia: A likely cause of CKD-associated inflammation. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, n. 7, p. 2686–2693, 2012.

VENTURA, M. et al. Host–microbe interactions that facilitate gut colonization by commensal bifidobacteria. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 10, p. 467–476, out. 2012.

VICTORA, C. G. et al. Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. **The Lancet**, v. 371, n. 9609, p. 340–357, jan. 2008.

VISKER, J. R.; FERGUSON, D. P. Postnatal undernutrition in mice causes cardiac arrhythmogenesis which is exacerbated when pharmacologically stressed. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 9, n. 4, p. 417–424, 12 ago. 2018.

VLASOVA, A. N. et al. How the gut microbiome regulates host immune responses to viral vaccines. **Current Opinion in Virology**, v. 37, p. 16–25, ago. 2019.

VOGT, J. A. et al. L-Rhamnose and Lactulose Decrease Serum Triacylglycerols and Their Rates of Synthesis, but Do Not Affect Serum Cholesterol Concentrations in Men. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 8, p. 2160–2166, 1 ago. 2006.

VONAESCH, P. et al. Stunted childhood growth is associated with decompartmentalization of the gastrointestinal tract and overgrowth of oropharyngeal taxa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 36, p. E8489–E8498, 4 set. 2018.

WALSON, J. L.; BERKLEY, J. A. The impact of malnutrition on childhood infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 31, n. 3, p. 231–236, jun. 2018.

WANG, Y. et al. Capsaicin has an anti-obesity effect through alterations in gut microbiota populations and short-chain fatty acid concentrations. **Food and Nutrition Research**, v. 64, n. 2, p. 1–14, 2020a.

WANG, Y. et al. Economic Status Moderates the Association Between Early-Life Famine Exposure and Hyperuricemia in Adulthood. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 105, n. 11, 1 nov. 2020b.

WATERLOW, J. C. et al. The presentation and use of height and weight data for comparing the nutritional status of groups of children under the age of 10 years. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 55, n. 4, p. 489–498, 1977.

WELLS, J. C. et al. The double burden of malnutrition: aetiological pathways and consequences for health. **The Lancet**, v. 395, n. 10217, p. 75–88, 2020.

WHO. Weekly epidemiological record - Varicella and herpes zoster vaccines: WHO position paper, June 2014. **Weekly Epidemiological Record**, v. 89/2014, n. 25, p. 265–288,

2014.

WILLIAMS, B. L. et al. Application of Novel PCR-Based Methods for Detection, Quantitation, and Phylogenetic Characterization of *Sutterella* Species in Intestinal Biopsy Samples from Children with Autism and Gastrointestinal Disturbances. **mBio**, v. 3, n. 1, p. 161–162, mar. 2012.

WILLIAMS, P. C. M.; BERKLEY, J. A. Sever Acute Malnutrition Update: Current WHO Guidelines and the WHO Essential Medicine List for Children. **Who**, n. November, p. 1–40, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics 2021: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals**. [s.l: s.n.].

WROBLEWSKA, Z. et al. A mouse model for varicella-zoster virus latency. **Microbial Pathogenesis**, v. 15, n. 2, p. 141–151, ago. 1993.

WU, G. Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition. **Amino Acids**, v. 37, n. 1, p. 1–17, 2009.

WU, G.; MORRIS, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochemical Journal**, v. 336, n. 1, p. 1–17, 15 nov. 1998.

YANG, X. O. et al. STAT3 Regulates Cytokine-mediated Generation of Inflammatory Helper T Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 13, p. 9358–9363, 30 mar. 2007.

YANNI, A. E. et al. Oral supplementation with L-aspartate and L-glutamate inhibits atherogenesis and fatty liver disease in cholesterol-fed rabbit. **Amino Acids**, v. 38, n. 5, p. 1323–1331, 2010.

YAP, I. K. S. et al. Metabonomic and microbiological analysis of the dynamic effect of vancomycin-Induced gut microbiota modification in the mouse. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 9, p. 3718–3728, 2008.

YASUDA, M. et al. Immunomodulatory activity of enzymatically synthesized glycogen and its digested metabolite in a co-culture system consisting of differentiated Caco-2 cells and RAW264.7 macrophages. **Food & Function**, v. 4, n. 9, p. 1387, 2013.

YATSUNENKO, T. et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 222–7, 2012.

YU, D. et al. Long-term Diet Quality and Gut Microbiome Functionality: A Prospective, Shotgun Metagenomic Study among Urban Chinese Adults. **Current Developments in Nutrition**, v. 5, n. 4, p. 1–8, 2021.

YUAN, X. et al. Gut Microbiota of Chinese Obese Children and Adolescents With and Without Insulin Resistance. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, n. March, p. 1–10, 2021.

YUAN, Z. -L. et al. Central Role of the Threonine Residue within the p+1 Loop of Receptor Tyrosine Kinase in STAT3 Constitutive Phosphorylation in Metastatic Cancer Cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 21, p. 9390–9400, 1 nov. 2004.

ZAMAN, K. et al. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in Asia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v. 376, n. 9741, p. 615–623, ago. 2010.

ZEEVI, D.; KOREM, T.; SEGAL, E. Talking about cross-talk: The immune system and the microbiome. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, p. 1–4, 2016.

ZERBONI, L. et al. Varicella-zoster virus infection of human dorsal root ganglia in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 18, p. 6490–6495, 2005.

ZHAO, X. et al. Response of gut microbiota to metabolite changes induced by endurance exercise. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. APR, p. 1–11, 2018.

ZHUANG, L. et al. Intestinal Microbiota in Early Life and Its Implications on Childhood Health. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 17, n. 1, p. 13–25, fev. 2019.

ZIMMERMANN, P. et al. Association between the intestinal microbiota and allergic sensitization, eczema, and asthma: A systematic review. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 143, n. 2, p. 467–485, 2019.

ZIMMERMANN, P.; CURTIS, N. The influence of the intestinal microbiome on vaccine responses. **Vaccine**, v. 36, n. 30, p. 4433–4439, jul. 2018.

10. ANEXOS

Artigo publicado em coautoria durante período de pós-graduação. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112791>

Behavioural Brain Research 393 (2020) 112791



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr

Research report

Prophylactic effect of physical exercise on $A\beta_{1-40}$ -induced depressive-like behavior and gut dysfunction in mice



Julia M. Rosa^a, Francis L. Pazini^a, Anderson Camargo^a, Ingrid A.V. Wolin^a, Gislaine Olescowicz^b, Livia B. Eslabão^c, Oscar Bruna Romero^c, Elisa C. Winkelmann-Duarte^d, Ana Lúcia S. Rodrigues^{a,*}

^a Department of Biochemistry, Center of Biological Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina 88040-900, Brazil

^b Department of Pharmacology, Center of Biological Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina 88040-900, Brazil

^c Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Center of Biological Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina 88040-900, Brazil

^d Department of Morphological Sciences, Center of Biological Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina 88040-900, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Alzheimer's disease
 Amyloid β_{1-40} peptide
 Intestine
 Microbiota
 Physical exercise

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a prevalent neurodegenerative disease that is highly comorbid with depression. Gut dysfunction has been proposed as a possible risk factor for both clinical conditions. In the present study, we investigated the ability of treadmill exercise for 4 weeks (5 days/week, 40 min/day) to counteract amyloid β_{1-40} peptide ($A\beta_{1-40}$)-induced depressive-like behavior, alterations in morphological parameters of the duodenum, and the abundance of Firmicutes and Bacteroidetes phyla. $A\beta_{1-40}$ administration (400 pmol/mouse, i.c.v.) increased immobility time in the tail suspension test (TST) and reduced time spent sniffing in the female urine sniffing test (FUST), indicating behavioral despair and impairment in reward-seeking behavior. These behavioral alterations, indicative of depressive-like behavior, were accompanied by reduced villus width in the duodenum. Moreover, photomicrographs obtained by transmission electron microscopy revealed abnormal epithelial microvilli in the duodenum from sedentary $A\beta_{1-40}$ -exposed mice, characterized by shorter microvilli and heterogeneity in the length of these structures that exhibit a disordered packing. Regarding the ultrastructure of Paneth cells, $A\beta_{1-40}$ administration caused a reduction in the secretory granule diameter, as well as an enlarged peripheral halo. These animals also presented reduced Firmicutes and increased Bacteroidetes abundance, and increased Bacteroidetes/Firmicutes ratio. Most of the alterations observed in $A\beta_{1-40}$ -exposed mice were prevented by the practice of physical exercise. Altogether the results provide evidence of the prophylactic effect of physical exercise on $A\beta_{1-40}$ -induced depressive-like behavior and gut dysfunction in mice, suggesting that physical exercise could be useful for preventing depression associated with AD.