



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

JÚLIA MARTINS DE LIMA

**BUSCA PELA PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO ANIMAL DE DEPRESSÃO
PARA ESTUDOS DO EIXO MICROBIOTA-INTESTINO-CÉREBRO**

FORTALEZA

2022

JÚLIA MARTINS DE LIMA

BUSCA PELA PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO ANIMAL DE DEPRESSÃO PARA
ESTUDOS DO EIXO MICROBIOTA-INTESTINO-CÉREBRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia. Área de concentração: Neurofarmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Miyajima
Coorientador: Prof. Dra. Danielle Macedo Gaspar

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos
pelo(a) autor(a)

L698b Lima, Júlia Martins de.

Busca pela padronização de um modelo animal de depressão para estudos do eixo
microbiota-intestinocérebro / Júlia Martins de Lima. – 2023.

97 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Programa de PósGraduação em Farmacologia, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Fabio Miyajima.

Coorientação: Profa. Dra. Danielle Macedo Gaspar.

1. Modelos animais. 2. Depressão. 3. Microbiota intestinal. 4. Antidepressivos. I.
Título.

CDD 615.1

JÚLIA MARTINS DE LIMA

BUSCA PELA PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO ANIMAL DE DEPRESSÃO PARA
ESTUDOS DO EIXO MICROBIOTA-INTESTINO-CÉREBRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia.
Área de concentração: Neurofarmacologia.

Aprovada em: 30/novembro/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabio Miyajima
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Wesley Lyevertton Correia Ribeiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr.a Caren Nadia Soares de Sousa
Centro Universitário da Grande Fortaleza (UNIGRANDE)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por todo suporte e por nunca medirem esforços para me proporcionar a melhor educação possível ao longo de toda a minha vida.

Agradeço ao meu companheiro Yuri por toda compreensão, apoio e motivação ao longo dessa jornada.

Agradeço aos meus orientadores por toda a confiança, a disponibilidade e o estímulo na realização deste trabalho.

Agradeço a UFC e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pelo ensino com excelência.

Ao CNPQ, pelo fomento à pesquisa.

RESUMO

BUSCA PELA PADRONIZAÇÃO DE UM MODELO ANIMAL DE DEPRESSÃO PARA ESTUDOS DO EIXO MICROBIOTA-INTESTINO-CÉREBRO

O conjunto de microrganismos intestinais e seus produtos metabólicos são reconhecidos por regular inúmeros processos fisiológicas no organismo humano, incluindo a regulação do Sistema Nervoso Central através de um chamado eixo microbiota-intestino-cérebro. Doenças neuropsiquiátricas como a depressão, e o seu tratamento, parecem estar sob grande influência desses comensais. Os modelos animais sempre tiveram grande importância nas pesquisas biomédicas e têm sido de grande serventia para estudos do eixo microbiota-intestino-cérebro. Apesar de muitos estudos demonstrarem alterações na microbiota intestinal de modelos animais de depressão, existe ainda uma grande variabilidade entre os achados. Muitas das dissimilaridades dependem de fatores como o delineamento experimental, a dieta dos animais, a natureza, o tempo e a intensidade dos protocolos de indução, a coleta de amostras, o método de extração de DNA fecal, bem como as técnicas de sequenciamento e de bioinformática utilizadas para análise da microbiota. Nesse contexto, o trabalho objetivou a padronização de um modelo animal de depressão para estudos do eixo microbiota-intestino-cérebro. Os animais foram expostos a um protocolo de Estresse Crônico Moderado Imprevisível de seis semanas e tratados oralmente com Sertralina por três semanas (10 mg/Kg). Ao final do protocolo, os animais passaram por testes comportamentais de avaliação da atividade locomotora, social, depressiva e ansiogênica. Amostras fecais foram colhidas e processadas para o sequenciamento direcionado do gene 16S rRNA. Os resultados demonstraram que o modelo proposto foi capaz de ocasionar alterações fenotípicas nos animais, mas não alterações comportamentais satisfatórias. O modelo também não se demonstrou capaz de impactar os índices de diversidade da microbiota intestinal dos animais. Dessa forma, foi concluído que o modelo não foi satisfatório para estudos do eixo microbiota-intestino-cérebro. Uma contínua busca pela padronização de modelos animais para estudos dessa natureza apresenta-se necessária, de forma a melhorar a reprodutibilidade dos trabalhos e garantir resultados mais consistentes e representativos.

Palavras-chave: Modelos animais. Depressão. Microbiota intestinal. Antidepressivos.

ABSTRACT

PURSUITING THE PADRONIZATION OF AN ANIMAL MODEL OF DEPRESSION TO STUDIE THE MICROBIOTA-INTESTINE-BRAIN AXIS

The set of intestinal microorganisms and their metabolic products are recognized by physiological regulatory activity in many processes in the human body, including the regulation of the Central Nervous System. Neuropsychiatric disorders such as depression, and their treatment, seems to be under great influence of these commensals. Although many studies demonstrate alterations in the intestinal microbiota of animal models of depression, there is still great variability among the findings. Many of the dissimilarities depend on factors such as the experimental design, the diet of the animals, the nature, time and intensity of the induction protocols, the collection of samples, the fecal DNA extraction method, as well as the sequencing and bioinformatics techniques used for microbiota analysis. In this context, the work aimed to standardize an animal model of depression for studies of the microbiota-gut-brain axis. The animals were exposed to a six-week Moderate Unpredictable Chronic Stress protocol and orally treated with Sertraline for three weeks (10 mg/Kg). At the end of the protocol, the animals underwent behavioral tests to assess locomotor, social, depressive and anxiolytic behaviour. Fecal samples were collected being processed for targeted sequencing of the 16S rRNA gene. The results showed that the proposed model was capable of causing phenotypic changes in the animals, but not behavioral changes. The model also did not prove to impact the diversity indices of the intestinal microbiota of the animals. Thus, it was concluded that the model was not satisfactory for studies of the microbiota-gut-brain axis. A continuous search for the standardization of animal models for the study of the microbiota-gut-brain axis is necessary, in order to improve the reproducibility of the works and guarantee more consistent and representative results.

Keywords: Animal models. Depression. Gut microbiota. Antidepressants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vias envolvidas na comunicação bidirecional do eixo microbiota-intestino-cérebro	24
Figura 2 – Esquema representativo dos efeitos do estresse crônico e da depressão na atividade do eixo intestino-cérebro	31
Figura 3 – Desenho experimental	41
Figura 4 – 16s RNA e regiões hipervariáveis	51
Figura 5 – Gel de eletroforese do produto de amplificação (aprox. 550 pb)	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Metabólitos produzidos pela microbiota intestinal e suas funções	20
Tabela 2 – Eventos indutores de estresse	39
Tabela 3 – <i>Primers</i> utilizados para a amplificação gênica	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensional
a.c	Antes de cristo
ADTs	Antidepressivos Tricíclicos
ASV	<i>Amplicon Sequence Variant</i>
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (<i>Brain derived neurotrophic factor</i>)
CEUA	Comissão de Ética em Pesquisa com Animais
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
CUMS	<i>Chronic Unpredictable Mild Stress</i>
DDM	Distúrbio Depressivo Maior
ECMI	Estresse Crônico Moderado Imprevisível
EPM	Erro Padrão da Média
HCl	Ácido Clorídrico
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
IMAOs	Inibidores de Monaminooxidase
ISRSs	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina
SCFAs	Ácidos Graxos de Cadeias Curtas (<i>Short Chain Fatty Acids</i>)
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
MAO	Monaminooxidase
MIC	Concentração Inibitória Mínima (Minimum Inibitory Concentration)
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
OD	Densidade Óptica
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pb	Pares de bases
SIR	Síndrome do Intestino Irritável
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervoso Entérico
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i>
TAE	Trisacetato

TGI	Trato Gastrointestinal
TMCs	Transtornos Mentais Comuns
TNF	Teste do Nado Forçado
UFC	Universidade Federal do Ceará

LISTA DE SÍMBOLOS

% Porcentagem

μL Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	A MICROBIOTA INTESTINAL	18
2.2	O EIXO MICROBIOTA-INTESTINO-CÉREBRO	22
2.3	ESTRESSE CRÔNICO E A DEPRESSÃO	29
2.4	OS ANTIDEPRESSIVOS	32
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVO GERAL	
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	METODOLOGIA	38
4.1	SUBMISSÃO A COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS	37
4.2	ANIMAIS	38
4.3	PROTOCOLO DE INDUÇÃO	38
4.4	TRATAMENTO FARMACOLÓGICO	40
4.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	41
4.6	PROTOCOLOS DE AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTO	43
4.6.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA – TESTE DO CAMPO ABERTO	43
4.6.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA – TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (“PLUS MAZE”)	44
4.6.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DEPRESSIVA – TESTE DO NADO FORÇADO	44
4.6.4	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO SOCIAL – TESTE DE SOCIABILIDADE DE 3 CÂMARAS	45
4.7	EUTANÁSIA E COLETA DO MATERIAL	46
4.8	ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL	47
4.8.1	EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS FECAIS PELO MÉTODO CTAB2X	47
4.8.2	AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 16S E SEQUENCIAMENTO	50
4.8.3	ANÁLISE DOS DADOS	53

4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5	RESULTADOS	55
5.1	PONDERAGEM	55
5.2	AVALIAÇÃO DA PELAGEM	56
5.3	RESULTADOS DAS AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS	57
5.3.1	TESTE DO NADO FORÇADO	57
5.3.1.1	NADO FORÇADO DIA 21	57
5.3.1.2	NADO FORÇADO DIA 45	58
5.3.2	TESTE DE INTERAÇÃO SOCIAL	59
5.3.3	TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	60
5.3.4	TESTE DO CAMPO ABERTO	61
5.4	RESULTADOS PRELIMINARES DO SEQUENCIAMENTO	62
5.4.1	ANÁLISES DE ALFA DIVERSIDADE	63
5.4.2	ANÁLISE DE COORDENADAS PRINCIPAIS (PCoA)	64
6	DISCUSSÃO	65
7	CONCLUSÃO	70
8	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

Um interesse sobre as comunidades microbianas de humanos e de outros animais têm crescido tremendamente nos últimos anos tendo em vista o crescente reconhecimento de que esses microrganismos, sobretudo os intestinais, têm uma importante participação na fisiologia, na nutrição, no metabolismo e na saúde de seus hospedeiros (ABONAHAS *et al.*, 2022). A microbiota intestinal, conjunto de microrganismos residente no intestino, é capaz de regular diversos processos fisiológicos, desempenhando funções que vão desde nutricionais e gastroprotetoras, até funções de imunomodulação e de regulação do Sistema Nervoso Central (CRYAN; DINAN, 2012; ROGERS *et al.*, 2016; KOH; LAL, 2018; VALDES *et al.*, 2018; LIU; WANG; WU, 2021). A interação entre microbiota e hospedeiro é o ponto chave nesses processos, sendo a composição da microbiota intestinal altamente dependente de fatores ligados ao hospedeiro, como a idade, dieta, geografia e estilo de vida (AFZAAL *et al.*, 2022). Diversas patologias estão sendo associadas a alterações nesse conjunto de microrganismos, como doenças metabólicas (FAN; PEDERSEN, 2021), doenças autoimunes (KHAN; WANG, 2020), doenças cardiovasculares (NOVAKOVIC *et al.*, 2020), doenças neurológicas (CRYAN *et al.*, 2020) e desordens neuropsiquiátricas (GENEROSO *et al.*, 2021). Além disso, a microbiota intestinal parece estar intimamente ligada a processos como a metabolização de fármacos, influenciando na efetividade de tratamentos e na apresentação de efeitos colaterais (COLOTTI; RINALD, 2020).

Distúrbios no chamado eixo microbiota-intestino-cérebro têm sido associados a diversas desordens de ordem neuropsiquiátrica, como depressão maior, transtornos de ansiedade, esquizofrenia, transtorno bipolar, autismo, Alzheimer, Parkinson, Esclerose múltipla e abuso de drogas (RUTSCH; KANTSJÖ; RONCHI, 2020; GENEROSO *et al.*, 2021; CHEN; XU; CHEN, 2021). Dentre elas, a depressão é a mais estudada no que concerne a esse eixo. Esta doença apresenta-se como um transtorno mental frequentemente encontrado na sociedade e que gera alto custo social e econômico, tendo em vista que atinge todas as faixas etárias e pode resultar em incapacitações graves e definitivas que elevam as demandas nos serviços de saúde (GOMES; MIGUEL; MIASSO, 2013). Os antidepressivos, medicamentos utilizados no tratamento desse distúrbio, constituem uma classe de fármacos que geralmente apresentam um longo tempo para início da resposta clínica, além disso, estão frequentemente associados à perda de resposta e/ou efetividade do tratamento, à baixa aderência e

tolerabilidade, e à grande variabilidade de respostas pelos pacientes (TARGUM, 2014; VIEIRA *et al.*, 2010). Tendo em vista a participação dos comensais bacterianos tanto na regulação do Sistema Nervoso Central como na atividade de fármacos, a microbiota intestinal parece estar relacionada tanto com a fisiopatologia da depressão como com a efetividade de seu tratamento.

Os modelos animais sempre tiveram grande importância nas pesquisas biomédicas e têm sido de grande serventia para estudos do eixo microbiota-intestino-cérebro (THERGARAJAN; BHASSU, 2022). Prevê-se que estudos sobre a composição da microbiota intestinal tornara-se rotina para o desenvolvimento de drogas que visam o tratamento dos transtornos psiquiátricos (CHAIT, 2020). Mas apesar de muitos estudos demonstrarem alterações na microbiota intestinal de modelos animais de depressão, existe ainda uma grande variabilidade entre os achados (HERSELMAN; BAILEY; BOBROVSKAYA, 2022). Muitas das dissimilaridades dependem de fatores como o delineamento experimental, a dieta dos animais, a natureza, o tempo e a intensidade dos protocolos de indução, a coleta de amostras, o método de extração de DNA fecal, e as técnicas de sequenciamento e de bioinformática utilizadas para análise da microbiota (HUANG *et al.*, 2022). A verdade é que dada a grande complexidade e variabilidade interpessoal da microbiota intestinal, os achados de diversidade e abundância microbiana em doenças como depressão e ansiedade tanto em animais quanto em humanos continuam inconsistentes e com baixa reprodutibilidade (BARANDOUZI *et al.*, 2020). Torna-se então de grande importância a busca pela padronização de modelos animais para estudo do eixo microbiota-intestino-cérebro, de forma a melhorar a reprodutibilidade dos trabalhos e garantir resultados mais consistentes e representativos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A MICROBIOTA INTESTINAL

O termo microbiota intestinal refere-se à comunidade essencialmente bacteriana que reside normalmente no intestino de humanos e de animais. Com mais de 1000 espécies e com cerca de 700 cepas descritas, a microbiota intestinal é dominada pelas bactérias anaeróbicas, mas também inclui organismos como vírus, bacteriófagos, protozoários, arqueas e fungos (LANKELMA *et al.*, 2015). O trato gastrointestinal humano é habitado por cerca de 10^{13} a 10^{14} microrganismos – mais de 10 vezes o número de células humanas em nosso organismo (GILL *et al.*, 2006). O genoma coletivo destes microrganismos, associado ao ambiente em que se encontram e à todas as condições ali presentes, designa-se microbioma intestinal, o qual contém cerca de 150 vezes mais genes do que o genoma humano (QIN *et al.*, 2010). O microbioma intestinal de humanos é composto por dois filos de bactérias dominantes: *Bacteroidetes* e *Firmicutes*. Apresenta em menor abundância outros filos como *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia* (ARUMUGAN *et al.*, 2011).

A relação com os microrganismos inicia-se a partir do nascimento, quando o bebê deixa o espaço intrauterino e tem o seu primeiro contato com os microrganismos oriundos, inicialmente da mãe, e mais tardiamente de alimentos e do próprio ambiente, até que uma densa microbiota se desenvolva (MACKIE; SEGHIR; GASKINS, 1999). A microbiota muda dinamicamente durante a vida, estabelecendo relações com seu hospedeiro em momentos críticos, como na infância, na adolescência e no envelhecimento. Nesses momentos, existe uma grande vulnerabilidade à fatores externos, que podem culminar em uma aumentada susceptibilidade a desenvolver doenças, possivelmente levando a adversidades de saúde mais tarde na vida. Distúrbios no desenvolvimento da microbiota durante a infância possuem o potencial de impactar significativamente a saúde, levando a diversos tipos de desordens, incluindo desordens mentais. De forma similar, a microbiota também contribui para o processo de envelhecimento e a trajetória de desordens neurodegenerativas (DINAN; CRYAN, 2017).

Existe uma grande simbiose entre o hospedeiro humano e os comensais bacterianos intestinais (MALARD *et al.*, 2021). Os microrganismos desenvolvem papel fundamental na homeostasia intestinal; estes fornecem fontes de energia como ácidos graxos voláteis, participam do metabolismo de glicose, lipídeos, aminoácidos e ácidos biliares, bem como participam da produção de vitaminas, como a vitamina K e vitaminas do complexo B (MCCAN *et al.*, 2020; PUTNAM; GOODMAN, 2020; WU *et al.*, 2021). Isso se dá através de suas atividades metabólicas que ocorrem pela utilização de fontes alimentares humanas e pela habitação em condições físico-químicas estáveis. Esta energia produzida contribui para diversas funções, incluindo a motilidade intestinal, a modulação de dores associadas ao Trato Gastrointestinal (TGI), a integridade da barreira intestinal e a resposta imune (NOGUEIRA, 2015). Ainda, as bactérias atuam protegendo o ambiente intestinal, tanto induzindo células T reguladoras (KONIECZNA, 2012), como produzindo substâncias antagonistas e competindo por recursos nutricionais ou sítios de adesão com microrganismos patogênicos, evitando assim infecções, como por *Clostridium difficile* (BUFFIE; PAMER, 2013). A microbiota intestinal também possui um papel trófico através da modulação da diferenciação e proliferação de células epiteliais intestinais, de células do sistema imune e de células hematopoiéticas (AZIZ *et al.*, 2012; YAN *et al.*, 2022), bem como participa da modulação de vias endócrinas e neuroendócrinas (RASTELLI, CANI, KNAUF, 2019). Além disso, foi demonstrado em estudo através de imagens 3D por microscopia confocal que a microbiota está intimamente ligada com o processo de vascularização do intestino, principalmente no período crítico de desenvolvimento pós-natal, agindo sobre as células de *Paneth*, responsáveis por secretar peptídeos antibacterianos que regulam a ecologia intestinal (STAPPENBECK, 2002).

As bactérias intestinais apresentam a capacidade de fermentação de substratos não digeríveis, como fibras e muco intestinal endógeno, sendo este um ponto chave na sua dinâmica com o organismo. Essa fermentação dá suporte ao crescimento de bactérias específicas que produzem ácidos graxos de cadeias curtas (SCFAs) e gases (WONG *et al.*, 2006) que desempenham inúmeras funções no organismo. Os principais SCFAs produzidos são o acetato, o propionato e o butirato. O propionato exerce a regulação da gliconeogênese e da sinalização de saciedade através de interação com receptores de ácidos graxos. Aumento nos níveis desse composto foi associado com a diminuição de estresse (BYRNE *et al.*, 2016). O acetato é o mais abundante SCFA e é essencial para o crescimento de diversas bactérias.

Este, alcança os tecidos periféricos do organismo onde é utilizado no metabolismo do colesterol e na lipogênese, participando centralmente também na regulação do apetite (FROST *et al.*, 2014). O butirato apresenta-se como a principal fonte de energia dos colonócitos (células do cólon), além disto é capaz de induzir a apoptose de células cancerígenas do cólon e ativar a gliconeogênese intestinal, produzindo efeitos benéficos sobre a homeostase energética (VADDER *et al.*, 2014). O butirato é essencial para as células epiteliais consumirem grande quantidade de oxigênio através da β oxidação, o que gera um estado de hipóxia que mantém o balanço do oxigênio no intestino, necessário para a manutenção da composição intestinal e da própria microbiota também (BYNDLOSS *et al.*, 2017). Além disso, os estudos têm demonstrado que os SCFAs são capazes de regular a neuroinflamação, modulando a produção e o recrutamento de células T, neutrófilos e citocinas (PARK *et al.*, 2019). Além dos SCFAs, uma série de outros metabólitos também são produzidos pela atividade da microbiota e desempenham diversas funções no organismo, como pode ser visto na tabela 1.

Tabela 1. Metabólitos produzidos pela microbiota intestinal e suas funções.

Metabólitos	Funções	Referências
Metabólitos dos ácidos biliares; incluindo o ácido desoxicólico (DCA) e ácido litocólico (LCA) efeitos	Regular o metabolismo dos ácidos biliares, colesterol, lipídios, glicose e Energia, Mostrar antimicrobianos, e ativar receptores nucleares do hospedeiro e sinalização celular caminhos.	RAM elirez-Mac Elimas et al., 2022
Metabólitos de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), como propionato e butirato	Regular a ingestão de alimentos e a secreção de insulina, também auxiliam na manutenção do corpo peso.	Psichas et al., 2015; Larraufie et al., 2018
Ácidos graxos de cadeia ramificada (BCFA), incluindo isobutirato, isovalerato	Inibição da histona desacetilase (HDAC), aumento da acetilação das histonas.	Mischke e PL Zurisch, 2016
Derivados do indol, incluindo indoxil sulfato e ácido indol-3-propiónico (IPA)	IPA exibe efeitos neuroprotetores, atua como um poderoso antioxidante, e regula a função de barreira intestinal. O indoxil sulfato é uma toxina urêmica que acumula - se no sangue de indivíduos com sistemas de excreção prejudicados.	Hendrikx e Schnabl, 2019
Lipopolissacarídeo (LPS), peptidoglicano (PGN), ácido lipoteicoico (LTA)	Regulação epigenética de genes no câncer colorretal, modulação da cromatina estrutura e atividade transcricional.	Lightfoot et al., 2013; Mischke e PL Zurisch, 2016
Os derivados fenólicos incluem 4-OH fenilacético ácido, urolitinas, enterodiol e 9-prenilnaringenina	Exibem efeitos antimicrobianos, mantêm a saúde intestinal e protegem contra estresse oxidativo.	Larrosa et al., 2010
Os metabólitos da colina incluem colina, N-óxido de trimetilamina (TMAO) e betaína	Regulando o metabolismo lipídico, e a síntese de glicose contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.	Smallwood et al., 2016
As poliaminas incluem putrescina, espermidina e espermina	Sustentar a alta taxa de proliferação das células epiteliais intestinais aumenta integridade da barreira intestinal e potencializa o sistema imunológico adaptativo sistemático sistema.	Rooks e Garrett, 2016; Tofalo et al., 2019
Vitaminas, incluindo tiamina (B1), riboflavina (B2), ajudam na formação de glóbulos vermelhos, replicação de DNA e reparo, funcionam como um niacina (B3), piridoxina (B6), ácido pantotênico (B5), biotina (B7), folato (B11-B9), cobalamina (B12), e menaquinona (K2)	Exibem efeitos antimicrobianos, mantêm a saúde intestinal e protegem contra estresse oxidativo.	Nicholson et al., 2012; Forster et al., 2017
Etanol	Os metabólitos da fermentação proteica podem estar envolvidos na progressão da DHGNA.	Yao et al., 2016; Wu et al., 2021
Sulfeto de hidrogênio (H2s)	Redução / neutralização de espécies reativas de oxigênio.	Afana'EV, 2014; Mischke e Pl zurisch, 2016

Fonte: *Frontiers in Microbiology* (2022) 13:999001

Em outro âmbito metabólico, podemos destacar a contribuição da microbiota na metabolização de substâncias endógenas e xenobióticos, incluindo produtos naturais, drogas sintéticas, poluentes e pesticidas (JOUROVA; ANZENBACHER; ANZEBACHEROVA, 2016; NAKOV; VELIKOVA, 2020). A microbiota é responsável por secretar uma gama de enzimas (redutases, glicosidases, sulfatases, etc) que medeiam várias reações químicas nos organismos. Algumas reações são catabolizadas por enzimas produzidas apenas pela microbiota, produzindo metabólitos únicos no intestino (KOPPEL; REKDAL; BALSUS, 2017). Além disso, as bactérias intestinais influenciam na expressão gênica de enzimas hepáticas, incluindo proteínas do citocromo P450 (JOUROVÁ *et al.*, 2020). Diferenças na composição da microbiota, não só em humanos como em animais, afeta significativamente a ação e toxicidade de drogas, possivelmente explicando a variabilidade de respostas individuais a tratamentos. Assim, alterações na composição da microbiota podem resultar em modificações dos perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos de substâncias, influenciando na efetividade de tratamentos e na apresentação de efeitos colaterais (NOH *et al.*, 2017).

O microbioma intestinal trata-se de um ambiente bastante complexo e bastante competitivo; além da quantidade enorme de microorganismos que abriga, acumula uma variedade de metabólitos obtidos pelas mais diversas fontes e variados processos. A disbiose, desequilíbrio da composição microbiana, é uma condição que reduz a capacidade de absorção de vários nutrientes como cálcio, fósforo, magnésio, ferro, zinco e selênio, causando carência de vitaminas, principalmente do complexo B, além de vitaminas D, C, A e K6. Essa disfunção pode ser caracterizada por uma redução na diversidade microbiana, bem como uma perda de bactérias com perfil benéfico (como produtores de butirato), e um aumento de patobiontes, bactérias simbióticas que podem se tornar patogênicas sobre certas condições, como proteobactérias (HUMPHREYS, 2020). A disbiose também favorece o aumento da permeabilidade da barreira intestinal, permitindo a entrada de alimentos não digeridos, resíduos tóxicos, assim como antígenos e microorganismos na corrente sanguínea (WALKER; LAWLEY, 2013; LEVY *et al.*, 2017). Essa disfunção, além de trazer repercussões metabólicas, traz também repercussões inflamatórias que podem impactar profundamente a saúde dos indivíduos, propiciando ou contribuindo com o desenvolvimento de diversas desordens (GABELE *et al.*, 2011). Seu papel metabólico e sua contribuição para produção de energia, bem como para a síntese de vitaminas e para a absorção de minerais é essencial a inúmeras funções biológicas. Autores classificam a microbiota intestinal como um “órgão vital” devido

sua comunicação multidirecional com os diversos sistemas do organismo através de vias neurais, endócrinas, humorais, imunológicas e metabólicas (AFZAAL *et al.*, 2022). Assim, além do seu papel notório no trato gastrointestinal e metabolismo, a comunidade bacteriana intestinal vem sendo estudada afim de revelar sua influência em vários aspectos fisiológicos, incluindo a função cerebral.

2.3 O EIXO MICROBIOTA-INTESTINO-CÉREBRO

Há muito é reconhecido o papel que o Sistema Nervoso Central (SNC) exerce sobre o intestino, regulando funções gastrointestinais como a motilidade, a secreção de mucina, a produção hormonal e a produção de citocinas por células do sistema imune associado a mucosa intestinal (MAYER, 2011). Por outro lado, nos últimos anos têm se demonstrado que o intestino, aliado à sua estrutura neuronal, e aliado à comunidade microbiana e seus metabolitos, possui a capacidade de modular o SNC (RUTSCH; KANTSJÖ; RONCHI, 2020). O trato gastrintestinal possui uma rede complexa de fibras nervosas que envolve a presença de 200 a 600 milhões de neurônios, denominada de Sistema Nervoso Entérico (SNE). Ele interage com a maior superfície do corpo humano, a intestinal, aproximadamente 100 vezes maior que a área da superfície da pele; interage com a maior população de microrganismos comensais do corpo humano e com o sistema imune associado ao intestino, que possui dois terços das células do sistema imunológico do organismo (MAYER, 2011). O SNE, descoberto no século XIX, foi classificado inicialmente como uma extensão periférica do sistema límbico alojado nas camadas do intestino. Apesar da autonomia a qual possui, o SNE não costuma funcionar sozinho, agindo, na maioria das vezes, em sintonia com o Sistema Nervoso Central. A abrangência e a extensão da rede de neurônios do SNE são surpreendentes ao ponto que, por seu tamanho e por sua importância funcional, é chamado de “segundo cérebro” por alguns autores (MAYER, 2011; ZHOU; FOSTER, 2015).

Dada a grande influência da microbiota nos processos fisiológicos, tais quais processos metabólicos e regulação do sistema imune, além de sua íntima relação com o trato gastrointestinal e o SNE, a comunidade microbiana intestinal vem sendo foco de estudos sobre o cérebro e comportamento, emergindo o conceito de um eixo microbiota-intestino-cérebro (AIDY; DINAN; CRYAN, 2014). A alta comorbidade entre sintomas psiquiátricos relacionados ao estresse, como depressão e ansiedade, e desordens gastrointestinais, como a

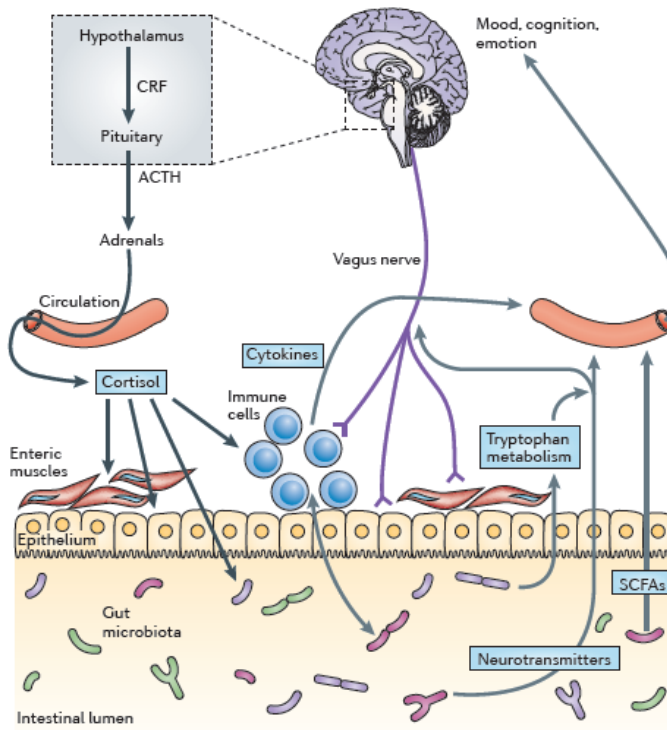
Síndrome do Intestino Irritável (SIR), evidenciaram a importância desse eixo (PERSON; KEEFER, 2021). Distúrbios no eixo microbiota-intestino-cérebro têm sido associados a diversos transtornos de ordem neuropsiquiátrica, como depressão maior, transtornos de ansiedade, esquizofrenia, transtorno bipolar, autismo, Alzheimer, Parkinson, Esclerose múltipla e abuso de drogas (RUTSCH; KANTSJÖ; RONCHI, 2020; GENEROSO *et al.*, 2021; CHEN; XU; CHEN, 2021). Esse novo conceito traz oportunidades para potenciais intervenções nas doenças gastrointestinais e disfunções cerebrais.

Observa-se que esse eixo atua através de rotas neuronais (via nervo vago e SNE), endócrinas (hormônios intestinais e cortisol), imunes (citocinas) e que ocorre de forma bidirecional (CRYAN; DINAN, 2012). Na rota neuronal todos os componentes do sistema nervoso autônomo estão envolvidos, incluindo os nervos simpáticos, parassimpáticos e o sistema nervoso entérico (SNE). O complexo simpático tem como função o monitoramento da motilidade intestinal, a ativação imunológica e o controle do fluxo sanguíneo, inervando as regiões vasculares do TGI e do SNE, abrangendo principalmente locais de alta atividade imunológica como a lâmina própria e as Placa de Peyer (FURNESS, 2012). O sistema parassimpático desempenha papel nas vias de comunicação intestino-cérebro através do nervo vago, principal componente das vias parassimpáticas e que possui atividade tanto aferente como eferente. Este é o maior e mais complexo dos nervos craniano, suas funções incluem a bronquioconstrição e regulação da respiração, regulação da frequência cardíaca e regulação do peristaltismo intestinal (ZHOU; FOSTER, 2015). A função mais importante do vago é aferente, trazendo informações dos órgãos internos como intestino, fígado, coração e pulmões para o cérebro. Isso sugere que os órgãos internos são a maior fonte de informações sensoriais para o cérebro, sendo o intestino o de maior superfície de contato (BREIT *et al.*, 2018). Cerca de 80% de suas fibras nervosas são sensoriais, transmitindo informações dos órgãos para o SNC. Sobre sua relação com a microbiota, o nervo vago aferente parece se tornar ativo pela microbiota intestinal e seus metabólitos, mediando ações sobre o sistema nervoso central que alteram a função encefálica e, conseqüentemente, o comportamento (CRYAN; DINAN, 2012).

De forma geral, o eixo envolve o sistema nervoso autônomo e entérico, o sistema endócrino, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), o sistema imune, a microbiota e os seus metabólitos. Vários metabólitos, muitos produzidos pela microbiota, como vitaminas essenciais, ácidos biliares, peptídeos, aminoácidos, neurotransmissores e SCAFs agem sobre o

sistema imunológico e influenciam o SNC, modulando funções como o comportamento, a memória, o aprendizado, a locomoção e a neurodegeneração (RUTSCH; KANTSJÖ; RONCHI, 2020).

Figura 1. Vias envolvidas na comunicação bidirecional entre a microbiota intestinal e o cérebro.



Fonte: Nature Reviews|Neuroscience (2012)13, p. 703.

A participação da microbiota na interação intestino cérebro pode ser demonstrada por diversos exemplos. Podemos citar que vários microorganismos foram associados a produção de neurotransmissores e seus metabólitos em modelos animais: *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.* na produção de acetilcolina e ácido γ -aminobutírico (GABA), um neurotransmissor com importantes repercussões no aprendizado, atenção e memória, e um neurotransmissor inibidor no sistema nervoso central dos mamíferos, respectivamente; *Escherichia spp.*, *Bacillus spp.* e *Saccharomyces spp.* na produção de noradrenalina, serotonina e dopamina (CRYAN; DINAN, 2012); *Bifidobacterium infantis* na produção de triptofano, um aminoácido essencial e precursor de muitos agentes biologicamente ativos, incluindo a serotonina e outras substâncias relevantes como a melatonina, além de metabólitos

como o ácido quinurênico, o ácido quinolínico e a nicotinamida (DESBONNET *et al.*, 2010; CRYAN; DINAN, 2012). Clarke *et al.* (2014) mostrou que manipulando-se a microbiota intestinal foi possível modular as concentrações plasmáticas de triptofano e seus metabólitos. Quase 90% da serotonina requerida para o comportamento, humor, sono e diversas outras funções cerebrais e intestinais é proveniente das células enterocromafins do intestino (GERSHON, 2013). Não surpreendente, essas células são ativadas por metabólitos da microbiota e expressam receptores para uma variedade de metabólitos microbiais, tendo ainda evidências do papel da microbiota na regulação gênica e na sinalização dessas células (COVASA *et al.*, 2019). O butirato produzido pelas bactérias por exemplo, é capaz de influenciar a liberação de serotonina pelas células enteroendócrinas intestinais, bem como é capaz de estimular a memória e a plasticidade neural através da inibição de enzimas (VECSEY *et al.*, 2007; REIGSTAD *et al.*, 2015). Em vários estudos, com vários modelos animais de desordens neuropsiquiátricas, como depressão, Alzheimer, transtorno bipolar, autismo, psicose e abuso de drogas, a administração de butirato teve efeitos benéficos sobre a função cerebral (RUTSCH; KANTSJÖ; RONCHI, 2020; GENEROSO *et al.*, 2021). A administração de butirato foi ainda capaz de reverter o processo de desmielinização e promover a remielinização neuronal em modelos animais (CHEN *et al.*, 2019). Já o propionato demonstrou-se capaz de proteger a barreira hematoencefálica contra estresse oxidativo (HOYLES *et al.*, 2018).

Outra forma de demonstração do papel fundamental da microbiota intestinal na regulação neurológica tem se dado através do uso de animais isentos de micróbios. A comparação de animais deficientes em germes com os seus pares convencionais mostrou que na ausência de microbiota o SNE apresenta redução dos gânglios e das fibras nervosas do plexo entérico, redução das contrações musculares intestinais espontâneas, redução da excitabilidade de neurônios aferentes, redução do potencial de membrana em repouso, redução da densidade de nervos e redução do número de neurônios por gânglio (HUSEBYE *et al.*, 2001; NEUFELD *et al.*, 2013). Achados muitos semelhantes foram vistos por Collins e colaboradores (2013) que também mostraram a importância dos comensais bacterianos pro desenvolvimento pós-natal do SNE, tanto estruturalmente como funcionalmente. Vadder e colaboradores (2018) também observaram a importância da microbiota no desenvolvimento do SNE de adultos através de vias serotoninérgicas. Heijtz *et al.* (2011) percebeu uma menor expressão de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (*BDNF*, do inglês Brain-derived

neurotrophic factor) em animais semelhantes. O *BDNF* é um importante fator proteico relacionado à plasticidade, que promove o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência neuronal, além de desempenhar um papel fundamental na aprendizagem, memória e regulação do humor (DINAN; CRYAN, 2017). Outro aspecto do neurodesenvolvimento que parece ser criticamente regulado pelo microbioma é a mielinização dos neurônios do córtex pré-frontal. Animais “*germ-free*” (livre de germes) apresentaram hiper mielinização dessa região, bem como um aumento da expressão de genes envolvidos com esse processo e com a plasticidade da mielina, mas o mesmo não foi visto em outras áreas cerebrais investigadas (HOBAN *et al.*, 2016). Achados similares também foram vistos em animais adultos tratados com antibióticos (GACIAS *et al.*, 2016). Desbonnet e colaboradores (2014) avaliaram uma deficiência no comportamento social e aumento de comportamentos repetitivos em animais *germ-free*, que foram revertidos após recolonização, trazendo repercussões importantes para os transtornos psiquiátricos, sobretudo para os transtornos do espectro autista. Animais livres de germes também apresentaram volume aumentado da amígdala com dendritos hipertrofiados na sua área basolateral, enquanto os neurônios piramidais possuíram espinhas dendríticas de aspecto mais fino, curtas e em formato de cogumelo em comparação aos animais com a microbiota preservada (LUCZYNSKI *et al.*, 2016). A amígdala é uma área crítica do cérebro que está envolvida com o comportamento social, incluindo o controle dos comportamentos ligados ao medo e ansiedade. Alterações estruturais e funcionais da amígdala são associadas com uma variedade de doenças neuropsiquiátricas, que vão desde o espectro do autismo (SCHUMANN *et al.*, 2006; MOSCONI *et al.*, 2009) às desordens de ansiedade (LEDOUX, 2007; JANAK; TYE, 2015). A ausência de microbiota durante o início da vida demonstrou diversas modificações na expressão de genes na amígdala, genes relacionados com a morfologia, com o metabolismo, com a neurotransmissão e com a neuroplasticidade desta área (STILLING *et al.*, 2015). O uso de animais isentos de micróbios, bem como de antibióticos, também possibilitou que muitos estudos conseguissem induzir sintomas depressivos e alterações neuronais com o transplante fecal de doadores portadores de TDM (SHEN *et al.*, 2021).

Muitos estudos também têm se dado através do uso de probióticos, conceituados desde antigamente como "micro-organismos vivos em quantidades suficientes que afetem beneficemente a saúde do hospedeiro animal por melhorar seu equilíbrio microbiano" (FULLER, 1989; SALMINEN *et al.*, 2021). Muitas vezes conceituados também como “alimentos contendo bactérias vivas que são benéficas para à saúde” (SALMINEN *et al.*,

1998). A inclusão de microrganismos em alimentos, principalmente nos derivados do leite, e a observação de benefícios à saúde com essa prática são antigos na história da ciência e do homem. Em uma versão persa do antigo testamento há uma passagem que diz: "Abraão devia sua longevidade ao consumo de leite azedo...". Em 76 a.c, os produtos lácteos também já haviam sido citados por Plínio, um historiador romano que dizia que estes poderiam ser administrados para o tratamento de gastroenterites (SCHREZENMEIR; DE VRESE, 2001). Em 1907, com o advento das técnicas em microbiologia, a primeira observação original dos benefícios dos microrganismos administrados em alimentos foi feita. O pesquisador russo, Élie Metchnikoff (1907) foi o pioneiro ao sugerir que: "A dependência de micróbios do intestino sobre a comida faz com que seja possível adotar medidas para modificar a flora em nossos corpos e substituir os micróbios nocivos por micróbios úteis." (ANUKAM; REID, 2007). Neste mesmo período, Henri Tissier começou a fazer as mesmas observações, mas indagando o porquê de crianças saudáveis, livres de diarreias intestinais, terem em suas fezes uma alta concentração de bactérias que ele observou ter forma de Y, e as nomeou de bífidas. Este pesquisador francês então sugeriu que estes microrganismos poderiam ser administrados a doentes para restaurar sua microbiota e assim acabar com patologias intestinais (NOGUEIRA, 2015).

Pesquisas modernas têm demonstrado o potencial dos probióticos além do trato gastrointestinal. Por exemplo, Gareau e colaboradores (2011) verificaram que camundongos induzidos a depressão por separação maternal tiveram o comportamento do tipo depressivo revertido com tratamento dos probióticos *L. rhamnosus* e *L. helveticus*, além de normalização da atividade do eixo HPA. De forma similar, *L. rhamnosus* reduziu o comportamento do tipo depressivo em camundongos através da redução da liberação de corticosterona plasmática e da regulação da expressão de receptores GABAérgicos em diferentes regiões do encéfalo, de uma forma dependente do nervo vago (utilização de vagotomia), no trabalho de Bravo *et al.* (2011). Com o mesmo modelo de indução por separação materna, Desbonnet *et al.* (2010) demonstrou que a bactéria *Bifidobacterium infantis* aliviou o comportamento do tipo depressivo, bem como diminuiu citocinas pró-inflamatórias e regulou o metabolismo do triptofano e de outros neurotransmissores no SNC de animais. Bactérias probióticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* também foram capazes de reverter o comportamento do tipo depressivo, reduzir a presença de citocinas pró-inflamatórias e restaurar a integridade da barreira do TGI em modelo de depressão induzido por infarto do miocárdio em ratos

(GILBERT *et al.*, 2013). Hao e colaboradores (2019) utilizaram o probiótico *Faecalibacterium prausnitzii* e conseguiram aliviar os sintomas depressivos e ansiosos de animais submetidos a estresse crônico moderado imprevisível, bem como regular os níveis de citocinas inflamatórias, corticosterona e proteína c reativa, com um aumento de SCFAs na região do ceco intestinal. Já o trabalho de Huang e colaboradores (2022) encontrou uma maior riqueza e distribuição uniforme de espécies na microbiota de animais quando tratados com um par de probióticos, em relação ao tratamento com um único probiótico, juntamente com a atenuação dos sintomas depressivos e ansiosos. Assim reforçando a necessidade do alcance de concentrações satisfatórias de microrganismos vivos ao intestino para atuação como probióticos ou psicobióticos.

Podemos ver que os modelos animais aparecem como de extrema importância para estudos dessa natureza e que uma variedade de estratégias vem sendo utilizadas para a analisar a regulação da relação intestino-cérebro pela microbiota intestinal, incluindo o uso de antibióticos, o uso de probióticos, o uso de animais isentos de germes e o transplante de microbiota fecal. Apesar da maioria das pesquisas focarem no impacto da microbiota no SNC, também vindo sendo demonstrado o impacto do estresse crônico na composição da microbiota e também no vazamento de componentes bacterianos através da barreira intestinal, como os lipopolissacarídeos (HERSELMAN; BAILEY; BOBROVSKAYA, 2022). Os mesmos fatores também parecem estar envolvidos com o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (TANG *et al.*, 2020). Alterações na microbiota intestinal associadas ao aumento da permeabilidade intestinal e da barreira hematoencefálica são condições altamente reconhecidas como relevantes para a patogênese de diversas doenças, incluindo doenças do trato gastrointestinal (KITAMOTO *et al.*, 2016), doenças autoimunes (PARAY *et al.*, 2020), desordens de humor (APPLETON, 2018) e doenças neurodegenerativas (ANDERSON *et al.*, 2016).

2.3 ESTRESSE CRÔNICO E A DEPRESSÃO

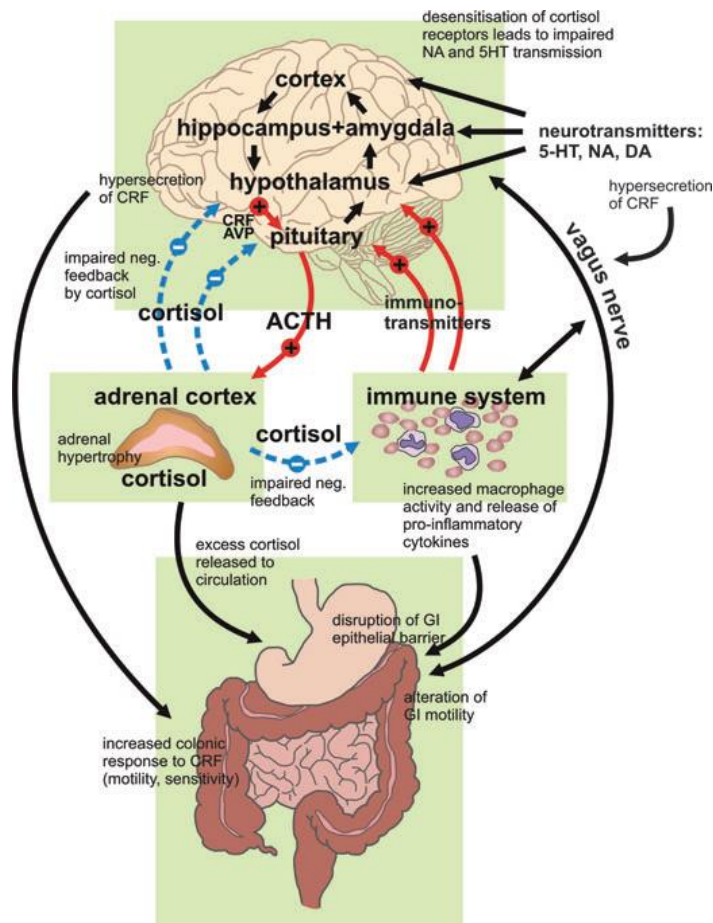
A depressão é uma doença enquadrada nos transtornos mentais comuns (TMCs), definidos como doenças com manifestações psicológicas associada a algum comprometimento funcional resultante de disfunção biológica, social, psicológica, genética, física ou química, podendo ser classificados ainda como alterações do modo de pensar e/ou do humor associados a uma angústia expressiva, produzindo prejuízos no desempenho global dos portadores no âmbito pessoal, social, ocupacional e familiar (SANTOS; SIQUEIRA, 2010). É caracterizada por afetar negativamente os sentimentos, pensamentos e atitudes das pessoas, apresentando vários sintomas dos quais o mais comum é o profundo sentimento de tristeza ou uma acentuada perda de interesse e prazer nas atividades (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE PSIQUIATRIA, 2017). Dependendo do número e gravidade dos sintomas, o episódio depressivo pode ser classificado como leve, moderado ou grave. Os sintomas incluem ainda: humor persistentemente triste, ansioso ou “vazio”; sentimentos de desespero e pessimismo; sentimento de culpa, desvalia e impotência; perda do interesse ou prazer em atividades que eram anteriormente apreciadas, incluindo sexo; energia diminuída, fadiga; dificuldade de se concentrar, recordar e tomar decisões; insônia, despertar precoce ou sono em excesso; distúrbios alimentares; pensamentos de morte ou suicídio; tentativas de suicídio; inquietação e irritabilidade; sintomas físicos persistentes que não respondem ao tratamento, como cefaleias, transtornos digestivos e dores crônicas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PSIQUIATRIA, 2012).

Em uma esfera global, estima-se que mais de 350 milhões de pessoas sofram de depressão. O número de pessoas vivendo com depressão cresceu em 18,4% entre os anos de 2005 e 2015, revelando uma tendência ao aumento de pessoas expostas aos fatores de risco relacionados a depressão (OMS, 2017). As tendências continuam aumentando; no cenário atual de pandemia de COVID-19, foi detectado um aumento de 25% nos casos de depressão e ansiedade apenas no primeiro ano pandêmico (OMS, 2022). A doença surge ainda como a maior contribuinte para os casos de invalidez e para as mortes por suicídio, que chegam a ultrapassar 800.000 casos por ano. A Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2019, apontou que no Brasil 10,2% das pessoas com 18 anos ou mais já receberam o diagnóstico de depressão, aproximadamente 16,3 milhões de pessoas.

A busca de bases neurofisiológicas para a depressão tem recebido investimentos crescentes em pesquisa nas últimas décadas. As dificuldades para avaliá-la são evidentes, devido à complexidade, bem como a dificuldade de acesso ao sistema nervoso central (SNC) para medidas bioquímicas. Apesar disso, existem muitos aspectos utilizados para explicar a etiologia da depressão, dentre elas o resultado da genética ligada a fatores ambientais como a dieta e o consumo de álcool, a menor disponibilidade de aminas biogênicas cerebrais, em particular de serotonina, noradrenalina e/ou dopamina e alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Os fatores psicossociais também estão entre os desencadeadores da depressão como, por exemplo, a perda de um familiar, de um emprego ou uma separação conjugal (NOGUEIRA, 2015). Em cerca de 60% dos casos, os episódios depressivos são precedidos pela ocorrência de tais fatores estressantes (KELLER; NEALE; KENDLER, 2007). Mais recentemente, como já foi indicado, estudos tem apontado a influência de microrganismos residentes do trato gastrointestinal no desenvolvimento da depressão e de outras doenças neurológicas.

Fatores estressantes constituem um risco para o desenvolvimento de transtornos de humor, induzindo a significativas mudanças comportamentais e fisiológicas, sendo a principal forma de acometimento de depressão na sociedade (PLIEGER *et al.*, 2015). Agentes estressores podem causar uma hipersecreção de cortisol (corticosterona em roedores) e conseqüentemente disfunções no eixo HPA, mediando uma forma de enfrentamento a adversidades que pode implicar na diminuição de atividade neuronal (STEWART *et al.*, 2004). Como vimos, a microbiota intestinal está intimamente ligada a regulação do eixo HPA. Da mesma forma, a microbiota intestinal parece estar intimamente ligada com a resposta ao estresse (Fig. 2). Um estudo mostrou que estudantes saudáveis tinham menos lactobacilos presentes em suas fezes durante momentos extremamente estressantes em comparação com períodos menos estressantes (DINAN; CRYAN, 2013). Ainda, a exposição ao estresse crônico em ratos adultos diminuiu a abundância relativa de espécies de bacteroides e aumentou as espécies de *Clostridium* no ceco. Além disso, modulou o sistema imunitário, com um aumento da interleucina-6 (BAILEY *et al.*, 2011). Em outro estudo, um estresse de separação materna entre 6 e 9 meses de idade em macacos Rhesus resultou na diminuição dos níveis de lactobacilos em suas fezes (BAILEY *et al.*, 2004).

Figura 2. Esquema representativo dos efeitos do estresse crônico e da depressão na atividade do eixo intestino-cérebro.



Fonte: *Neurogastroenterol Motil* (2013) **25**, p. 714.

2.4 OS ANTIDEPRESSIVOS

Os antidepressivos, fármacos utilizados no tratamento da depressão, estão entre a classe de medicamentos como maior aumento de consumo nos últimos anos (MOJTABAI; OLFSON, 2013; LUO *et al.*, 2020), tendo aumentado as prescrições em 35% nos últimos seis anos (BURNS, 2022). Desde 2010 os antidepressivos passaram a ser a terceira classe de medicamentos mais prescrita nos Estados Unidos (MOJTABAI; OLFSON, 2011). Isto se deve há vários fatores, incluindo o aumento da prevalência da depressão na sociedade e ao aumento da exposição a fatores de risco relacionados aos transtornos mentais (SKURTVEIT *et al.*, 2018). Hoje existem vários antidepressivos disponíveis no mercado e o uso terapêutico destas drogas tem se expandido bastante na prática clínica psiquiátrica nos últimos anos, sendo utilizadas no tratamento de outras desordens, como transtornos de ansiedade, síndrome do pânico, transtorno obsessivo compulsivo, transtorno pós-traumático, fobia social, dores neuropáticas, distúrbios alimentares, disforia pré-menstrual, psicose, transtornos do sono, além das formas mais brandas de depressão (ABLES; BAUGHMAN, 2003; CHENIAUX, 2006; NOORDAM *et al.*, 2015; YU *et al.*, 2020; SHEFFLER; ABDIJADID, 2021).

A história dos antidepressivos começa na década de 50, a chamada “Década de ouro” da psicofarmacologia, temporada em que houve grandes avanços no descobrimento de substâncias psicotrópicas. Nesse período, observações clínicas de pacientes medicados com iproniazida, droga derivada das hidrazinas e até então utilizada para o tratamento de tuberculose, revelaram melhora de humor e uma euforia dos indivíduos em tratamento. Tais efeitos psicoestimulantes despertaram a atenção dos pesquisadores, sendo subsequentemente demonstrada a propriedade da iproniazida de inibir a monaminoxidase (MAO), sistema enzimático capaz de metabolizar as aminas biogênicas (serotonina e catecolaminas) e outras aminas simpaticomiméticas. Assim, a partir do uso de uma substância com atividade antibacteriana, surgiu a primeira classe de antidepressivos, os inibidores de MAO (IMAOs), tais como a tranilcipromina e a fenelzina (LÓPEZ-MUÑOZ; ALAMO, 2009). Mais tarde, o desenvolvimento de uma molécula com grandes potenciais antidepressivos, a imipramina, abriu as portas para o surgimento de uma nova classe de medicamentos, os antidepressivos tricíclicos (ADTs), cujo mecanismo de ação envolve o bloqueio da recaptura de monoaminas (norepinefrina, serotonina e dopamina) pelos neurônios de forma não seletiva (BOURIN *et al.*, 2003). Até a década de 80, as duas classes de antidepressivos até então citadas,

revolucionaram o tratamento da depressão e trouxeram importantes conhecimentos para as hipóteses etiológicas dos transtornos depressivos. Embora muito eficazes, o risco de toxicidade e a apresentação de uma gama de efeitos colaterais indesejáveis devido a inespecificidade farmacológica dessas substâncias tornou-se uma preocupação (MORENO; MORENO; SOARES, 1999).

Visando encontrar medicamentos tão eficazes quanto os passados, mas com poucos problemas de tolerabilidade e de segurança, desenhos racionais de moléculas deram origem aos inibidores seletivos da receptação de serotonina (ISRSs), sendo a fluoxetina a primeira deles. Os ISRSs, os quais podemos citar além da pioneira fluoxetina, a paroxetina, sertralina, fluvoxamina e citalopram, inibem de forma potente e seletiva a recaptção de serotonina, resultando na intensificação da neurotransmissão serotoninérgica (GOODNICK; GOLDSTEIN, 1998). Apesar de compartilharem o principal mecanismo de ação, os ISRSs são estruturalmente distintos, com marcantes diferenças no perfil farmacodinâmico e farmacocinético. Podem apresentar ainda variações na potência da inibição de recaptção, assim como na afinidade por determinados neuroreceptores e na seletividade por outros neurotransmissores (noradrenalina e dopamina). Por exemplo, paroxetina e sertralina são os mais potentes inibidores da receptação de serotonina, sendo o último diferenciado também dos demais pelo seu relativo potencial em inibir a receptação de dopamina (STAHL; GRADY, 2003).

Embora os antidepressivos de nova geração apresentem um perfil mais tolerável de efeitos adversos devido sua maior especificidade, as queixas de efeitos colaterais ainda são frequentemente relatadas, e podem variar entre as diferentes moléculas da mesma classe. As ações adversas mais elencadas incluem: efeitos gastrointestinais (náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia, perda ou ganho de peso, anorexia); efeitos psicossomáticos (agitação, ansiedade, irritabilidade, confusão, alterações do sono, ciclagem para a mania); efeitos cardiovasculares; disfunções sexuais; reações dermatológicas; entre outras como xerostomia, sudorese e efeitos extrapiramidais (WANG *et al.*, 2018). As adversidades dos antidepressivos são os principais fatores para a descontinuação do tratamento. Cerca de 43% dos portadores de distúrbio depressivo maior (DDM) interrompem o uso dos medicamentos devido tais efeitos (HUNG, 2014). Apesar de ser um tratamento considerado efetivo, existe esta grande dificuldade de adesão por parte dos pacientes à farmacoterapia, primeiro devido à demora

para apresentação dos efeitos terapêuticos, também devido os exacerbados efeitos colaterais e a baixa tolerabilidade aos fármacos. Ainda, o uso inadequado desses fármacos, o que é muito comum, corrobora com recaídas e refratariedade farmacológica, colaborando ainda mais com o aumento de seu uso (WANG *et al.*, 2018).

Como relatado anteriormente, os antidepressivos apresentam atividade antimicrobiana desde sua origem histórica. Mediante esta propriedade, diversos estudos têm demonstrado os potenciais antimicrobianos *in vitro* e *in vivo* das várias classes de antidepressivos, desde os pioneiros IMAOs aos ISRS (MACEDO *et al.*, 2017). Os mecanismos para tal propriedade ainda não são totalmente esclarecidos, mas parecem envolver a formação de radicais que interagem com componentes bacterianos no caso dos IMAOs (JENA *et al.*, 2014), a inibição de atividade plasmidial no caso dos ADTs (MOLNÁR, 1988), a inibição de bombas de efluxo no caso dos ISRSs (KAATZ *et al.*, 2003) e uma citotoxicidade lipofílica não específica em casos de fungos, segundo Young (2003). Os antidepressivos também inibem uma série de processos presentes em bactérias, como a motilidade do tipo swarming e a produção de slime, indicando que eles também podem ter ação em processos metabólicos fundamentais, como a tradução de proteínas (MUNOZ-BELIDO; MUNOZ-CRIADO; GARCIA-RODRIGUES, 2000; NAYAK; SATPATHY, 2000; AYBEY; USTA; DEMIRKAN, 2014). Os ISRS têm demonstrado potente efeito antimicrobiano, tendo ação sobre bactérias (CHAIT *et al.*, 2020); vírus e parasitas (LIEB, 2004); fungos (ZHAI *et al.*, 2012) e protozoários (PALIT; ALI, 2008). O efeito deles parece ocorrer principalmente sobre bactérias Gram positivas, como dos gêneros *Staphylococcus* e *Enterococcus* (AYAZ *et al.*, 2015). Estas drogas podem ter efeitos antimicrobianos propriamente, como também apresentam efeitos sinérgicos juntamente a antibióticos, diminuindo a concentração inibitória mínimas destes, além de aumentarem a efetividade contra linhagens de bactérias resistentes a antibióticos (LI *et al.*, 2017). A sertralina é uma droga que tem apresentado elevado potencial antimicrobiano contra bactérias de relevância clínica. Esta droga, além de diminuir drasticamente a concentração inibitória mínima (MIC) de antibióticos, demonstrou em experimentos *in vitro* ser capaz de reverter o fenótipo de multirresistência a antibióticos de bactérias e, torna-las suscetíveis de novo (HENDRICKS, 2007; BOHNERT *et al.*, 2011; AYAZ *et al.*, 2015; KALAYCI; DEMIRCI; SAHIN, 2015). A droga também se destaca por possuir um elevado potencial antifúngico, apresentando-se como uma promissora opção terapêutica para infecções fúngicas (LASS-FLÖRL *et al.*, 2001; ZHAI

et al., 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Dada sua propriedade antimicrobiana, os SSRIs possuem capacidade de exercer uma constante pressão sobre o ambiente microbiano e afetar a diversidade das comunidades bacterianas, especialmente considerando que estes são tomados por longos períodos e de forma oral (MCGOVERN; HAMLIN; WINTER, 2019). Um simples antibiótico prescrito para matar um ou poucos patógenos específicos pode resultar rapidamente em um grande distúrbio na microbiota intestinal. A recuperação e estabilização dos níveis de diversidade bacterianos podem levar meses, e a nova composição bacteriana pode significativamente diferir daquela precedente ao tratamento (ROBINSON; YOUNG, 2010). A vancomicina, por exemplo, pode levar ao desaparecimento de bactérias tanto gram positivas como gram negativas da microbiota, resultando até em modificações mais dramáticas no organismo, como um déficit no metabolismo dos ácidos biliares e na sensibilidade a insulina (VRIEZE *et al.*, 2013). Em outros estudos seu uso pôde culminar em doenças como diabetes melitus, asma, atopia, artrite reumatóide, obesidade e doença do intestino irritável (KEENEY *et al.*, 2014). Champagne-Jorgensen e colaboradores (2020) observaram que a exposição de camundongos fêmeas grávidas á mínima dose de penicilina, durante apenas a última semana de gravidez, foi capaz de causar alterações de longo termo no comportamento, regulação imune e microbiota intestinal da prole.

Alterações na microbiota intestinal mediadas pela ação destes medicamentos, poderiam teoricamente interagir positivamente ou negativamente com a eficácia da droga, dependendo de qual grupo de microorganismos foi avantajado ou desvantajado pela pressão seletiva. O uso crônico dos antidepressivos poderia estar relacionado com o desenvolvimento de alterações adaptativas na microbiota intestinal, com potenciais efeitos deletérios (MACEDO *et al.*, 2017). Há vários meios pelo qual uma disbiose ocasionada pelo uso de SSRIS poderia teoricamente interferir com a eficácia por exemplo dos próprios antidepressivos. Em alguns estudos animais, disbioses induzidas por antibióticos mostraram uma redução dos níveis de BDNF no hipocampo, importante fator neurogênico nesta região (ORTEGA-MARTINEZ, 2015; DESBONNET *et al.*, 2015; FROHLICH *et al.*, 2016; GUIDA *et al.*, 2018). Dada a evidência de que a neurogênese hipocampal adulta é necessária para a ação de diversos antidepressivos (SAHAY; HEN, 2007), mudanças nos níveis de BDNF mediada por alterações na microbiota intestinal pode ser um mecanismo de ação pelo qual a

atividade antimicrobiana dos SSRIs poderia afetar o tratamento (MCGOVERN; HAMLIN; WINTER, 2019). Tal efeito sobre o BDNF, mediado pela microbiota intestinal, poderia ser ocasionado através de mudanças na sinalização do nervo vago (O'LEARY *et al.*, 2018) ou através da mudança na produção de metabólitos como o butirato, conhecido por aumentar os níveis de BDNF e exercer atividade do tipo antidepressiva (STILLING *et al.*, 2016). Ainda mais, modificações no sistema serotoninérgico também podem ser mediadas por alterações na microbiota nesta mesma região. Disbioses induzidas por antibióticos também demonstraram uma redução nos níveis hipocámpais de serotonina (HOBAN *et al.*, 2016). A ação antimicrobiana dos antidepressivos sobre a microbiota pode ser considerada como um efeito colateral, porém também poderia ser um possível mecanismo de ação dessas moléculas sobre o eixo intestino- cérebro (CHAIT, 2020). O trabalho de Shen e colaboradores (2021) detectou que a microbiota intestinal de pacientes que tiveram o primeiro episódio depressivo e nunca haviam iniciado o tratamento com antidepressivos diferia de controles saudáveis. Porém o tratamento com escitalopram foi capaz de restaurar os índices de diversidade da microbiota dos pacientes para o estado normal.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar um modelo animal de depressão para estudos do eixo microbiota-intestino-cérebro.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Organizar uma série de eventos estressores em um protocolo de estresse crônico moderado imprevisível para a indução de características do tipo depressiva em camundongos.
- Avaliar o impacto do protocolo de estresse crônico moderado imprevisível proposto sobre os comportamentos do tipo depressivo, ansioso, social e locomotor de camundongos.
- Determinar o impacto do protocolo de estresse crônico moderado imprevisível proposto sobre as características fenotípicas dos animais (peso e pelagem).
- Avaliar os efeitos do tratamento com o antidepressivo Sertralina sobre o modelo animal.
- Investigar a capacidade do modelo proposto em ocasionar alterações na microbiota intestinal dos animais.

4. METODOLOGIA

4.1 SUBMISSÃO A COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS

O presente estudo passou pela avaliação da Comissão de Ética em Pesquisa com Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (UFC), conduzida de acordo com os critérios estabelecidos na Lei nº11.794, de 2008, conhecida como Lei Arouca. O estudo foi protocolado sob nº CEUA 9904020519 (ID: 001052).

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos *Swiss (Mus musculus)* machos adultos (8 semanas de vida), pesando entre 20-30g, provenientes do Biotério do NPDM (Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais nasceram e foram mantidos sob condições SPF (*Specific pathogen free*) durante todo o protocolo experimental. Os animais foram alojados em gaiolas micro isoladoras de polipropileno com alimentos (ração) e água *ad libitum*, além de mantidos a um ciclo claro/escuro de 12 h, sendo ambientados por uma semana em grupos de até 05 animais por gaiola antes do início do protocolo. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América.

4.3 PROTOCOLO DE INDUÇÃO

Os animais foram expostos a um protocolo de Estresse Crônico Moderado Imprevisível (ECMI) de seis semanas. A incontrollabilidade e repetição de eventos estressores pode facilitar o desenvolvimento de transtornos mentais como a depressão, sendo, o ECMI, capaz de causar grande impacto neurofisiológico e respostas anedônicas que configuram perda da capacidade de sentir prazer (BAKER *et al.*, 2010). O modelo é considerado por muitos como o de maior validade para depressão e com maior potencial translacional (ANTONIUK *et al.*, 2019). Os estressores utilizados foram escolhidos com base nas metodologias mais utilizadas nos protocolos experimentais (WILLNER, 2017) e de acordo com as condições disponíveis no biotério. Os eventos possuíam intensidade, duração, frequência e horários de aplicação variados de forma a garantir a imprevisibilidade. A cada dia

os animais eram expostos à um único evento estressor. Os eventos também foram organizados de forma a acontecer com a mesma frequência no período pré-tratamento e no período de tratamento do protocolo. Esses, foram aplicados em salas separadas da sala a qual os animais permaneciam alojados (a exceção da iluminação noturna, que acontecia em prateleiras vazias distantes dos demais animais). Após o evento estressor, os animais permaneciam na sala de aplicação durante 1h para dissipação de odores antes de retornarem ao seu alojamento. Os animais não designados a experienciar o estresse, foram sempre manipulados nos mesmos horários da aplicação dos estressores em sua sala de estadia. Todos os estressores utilizados estão descritos na tabela 02.

Tabela 2. Eventos indutores de estresse.

Estressores	Descrição	Duração
Gaiola inclinada	As gaiolas dos animais foram colocadas em um ângulo de 45 graus.	2h
Gaiola vazia	Os animais foram colocados em gaiolas vazias, sem maravalha.	1h
Choque nas patas	Os animais receberam choques de 0,7mA a cada 10s na gaiola de esquiwa.	3 min
Ar quente	Os animais foram expostos a um fluxo de ar quente.	10 min
Contenção	Os animais foram colocados em um tubo sem saída e ventilado.	1h
Isolamento social	Os animais foram isolados em gaiolas individuais.	1h
Iluminação noturna	Contínua iluminação das caixas durante a noite.	12h

Fonte: Próprio autor com base nos principais estressores descritos na literatura (WILLNER, 2017).

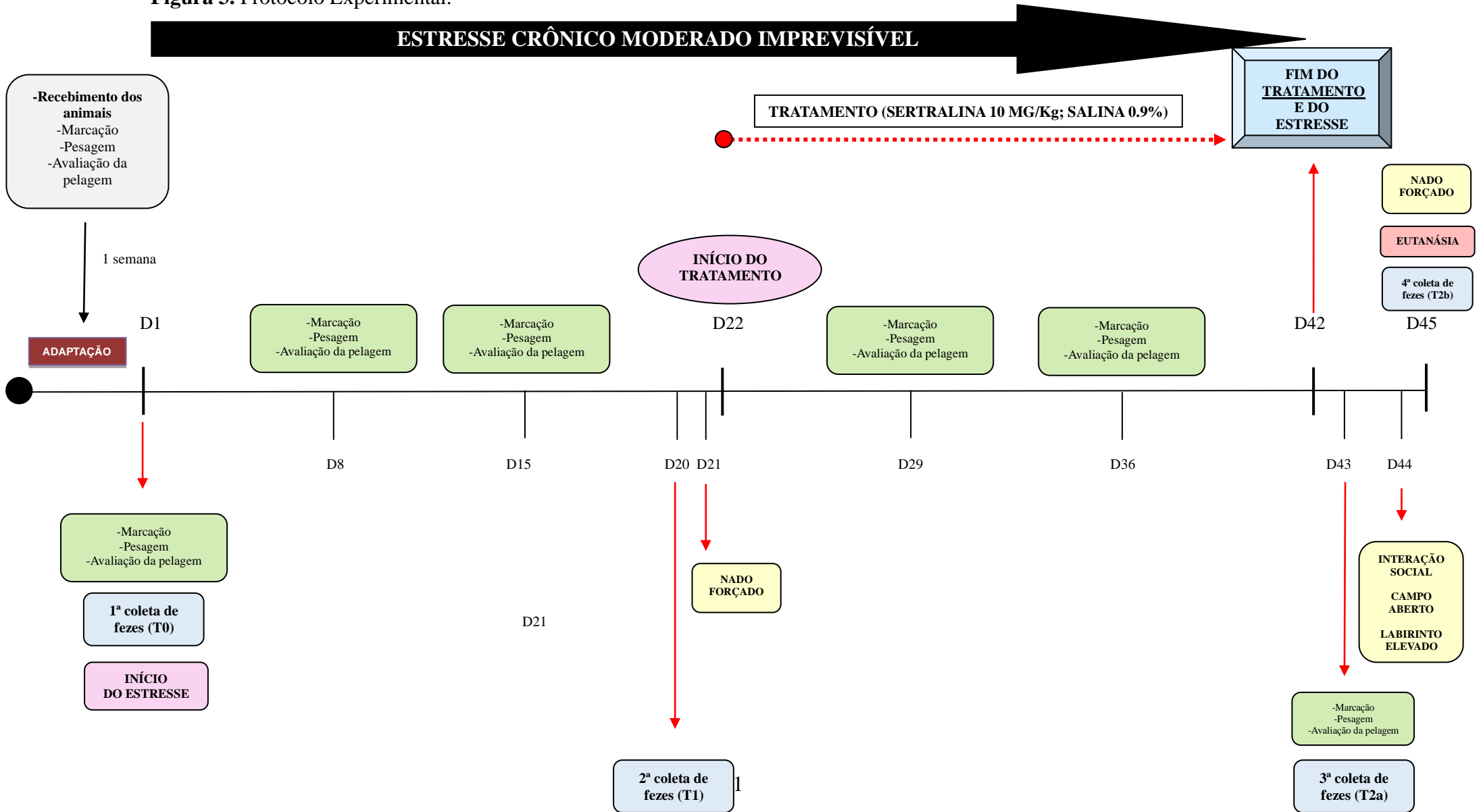
4.4 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

A droga de escolha para o tratamento dos animais foi o inibidor seletivo da recepção de serotonina, Sertralina. Esta é reportada como a 14^o droga mais prescrita nos Estados Unidos (FUENTES *et al.*, 2018) e o antidepressivo mais prescrito entre portadores de Transtorno Depressivo Maior (MARASINE *et al.*, 2021). Dentre os estudos de atividade antimicrobiana dos antidepressivos, a Sertralina tem demonstrado baixos valores de concentração inibitória mínima (MIC) e grande potencial antibacteriano, tanto em sinergismo com antibióticos como isoladamente (AYAZ *et al.*, 2015). Dentre várias drogas psicotrópicas que tiveram sua ação antimicrobiana estudada, a Sertralina vem se apresentando como a de maior potencial antimicrobiano e a que afeta mais cepas (BOHNERT *et al.*, 2011; HENDRICKS, 2007; KALAYCI; DEMIRCI; SAHIN, 2015; MCGOVERN; HAMLIN; WINTER, 2019), se apresentando como uma droga com grande potencial de interação com a microbiota intestinal.

Baseando-se em cálculos de transposição e levando em consideração a dose humana de 50 mg, a dose de Sertralina administrada via oral aos animais foi de 10mg/kg (NAIR; JACOB, 2016). Aos animais não designados a receber droga foi-se administrado solução salina durante o período de tratamento. Os animais foram tratados diariamente durante 3 semanas sempre no mesmo horário (1h da manhã).

4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Figura 3. Protocolo Experimental.



Os animais foram divididos aleatoriamente e ambientados por uma semana em um número de 8 gaiolas, contendo 5 animais cada, totalizando 40 animais. Metade dos animais (04 gaiolas) foram destinados a passar por um protocolo de Estresse Crônico Moderado Imprevisível - ECMI (ou CUMS de *chronic unpredictable mild stress*), enquanto a outra metade não sofreria nenhum estresse. Os animais seguiram o protocolo durante 20 dias, sendo avaliados pelo Teste do Nado Forçado (TNF) no 21º dia. No 22º dia foi realizado um sorteio para determinar o tratamento de cada caixa de animais (sertralina ou salina). Após o sorteio, os animais seguiram sendo tratados até o 42º dia de protocolo, onde os animais designados ao estresse continuaram a serem expostos a eventos estressores durante esse período. Assim, formaram-se 04 grupos com 10 animais cada (2 gaiolas), estes foram: **1** – Grupo Não Estressado (NS) + SAL: os animais não foram expostos a eventos estressores e receberam veículo (salina 0,9%) durante o período de tratamento do experimento; **2** – Grupo Não Estressado (NS) + SERT: os animais não foram expostos a eventos estressores e receberam tratamento com o antidepressivo Sertralina (10mg/kg) durante o período de tratamento do experimento; **3** – Grupo CUMS + SAL: os animais foram expostos a eventos estressores e receberam veículo (salina 0,9%) durante o período de tratamento do experimento; **4** – CUMS + SERT: os animais foram expostos a eventos estressores e receberam tratamento com o antidepressivo Sertralina (10mg/kg) durante o período de tratamento do experimento.

Os animais também foram pesados e passaram por avaliação da pelagem a cada semana. A avaliação da pelagem consistiu na determinação de scores qualitativos de diferentes regiões do corpo do animal: cabeça, pescoço, dorso, ventre, genitália, patas dianteiras, patas traseiras e rabo. Cada região recebia um score de 0 se apresentava-se em um bom estado (com a pelagem macia, limpa, brilhante e não espetada; sem injúrias na região); um score de 1 se apresentava-se em mau estado (pelagem suja, com manchas na coloração, sem brilho e espetada; com injúrias na região); e um score de 0,5 caso estivesse em um moderado estado (NOLLET, 2021). A avaliação era feita de forma individual por duas pessoas diferentes, que após análise revelavam seus scores, sendo feita uma média em caso de pontuações discordantes.

Os animais passaram por dois momentos de testes comportamentais, o primeiro já citado, no 21º dia de protocolo, sendo realizado o TNF. Ao final do protocolo, no 44º dia, foram realizados os testes de interação social, teste do campo aberto e teste do labirinto em cruz elevado. No 45º dia os animais passaram novamente pelo teste do nado forçado antes de serem eutanasiados.

Amostras de fezes foram coletadas em quatro momentos distintos do protocolo. A primeira coleta foi realizada no primeiro dia de protocolo antes do início de qualquer evento estressor, sendo designada como coleta T0 (ou *baseline*). A segunda coleta (T1) foi realizada no 20º dia de protocolo, antes de ser realizado o primeiro teste comportamental e antes do início do tratamento. A terceira coleta (T2a) deu-se no 43º dia de protocolo, após o fim do tratamento e do estresse crônico. As três primeiras coletas foram realizadas imobilizando-se os animais e coletando o bolo fecal expelido espontaneamente por estes diretamente em tubos estéreis. A quarta coleta (T2b) ocorreu no 45º dia de protocolo, após a eutanásia dos animais, sendo obtidas amostras fecais diretamente do lúmen do tecido intestinal.

4.6 PROTOCOLOS DE AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTO

4.6.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA - TESTE DO CAMPO ABERTO

O campo aberto consiste em um aparelho feito de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) e dividido em 9 quadrantes iguais. A metodologia de Archer (1973) foi utilizada para avaliar a atividade exploratória do animal. O principal parâmetro para observação foi o número de cruzamentos com as quatro patas (movimentação horizontal espontânea). O aparato foi colocado dentro de uma caixa com as paredes pretas e o teste foi realizado sob luz vermelha. Este teste foi realizado no 44º dia de protocolo, sendo filmado para posterior análise no software *ANY-maze 7.1*. Cada animal foi colocado no centro do aparato e os parâmetros foram registrados durante um tempo de 5 minutos, após 1 minuto de habituação. Entre cada animal o aparato foi higienizado com solução de álcool etílico 70%.

4.6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA - TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (“PLUS MAZE”)

O labirinto em cruz elevado (LCE) consiste em um aparato com dois braços abertos opostos (30 x 5 x 25 cm) e dois braços fechados opostos (30 x 5 x 25 cm), em forma de cruz, estando estes conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). A plataforma e as paredes laterais dos braços fechados são confeccionadas em acrílico branco e o chão em acrílico preto. O aparelho está elevado a uma altura de 45 cm do nível do chão. Este teste foi realizado no 44º dia de protocolo, sendo filmado para posterior análise no software *ANY-maze 7.1*. Os animais foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados, e o seu comportamento observado por 5 min (LISTER, 1990). Entre cada animal o aparato foi higienizado com solução de álcool etílico 70%. As medidas comportamentais registradas no LCE foram: frequência de entradas e o tempo dispendido nos braços abertos e fechados. Para análise estatística dos dados a percentagem de entradas nos braços abertos foi calculada dividindo-se a frequência de entradas nos braços abertos pela frequência total de entradas, e esse índice multiplicado por 100. De maneira semelhante foi calculada a percentagem do tempo em que os animais permaneceram nos braços fechados. Um aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços abertos revela um efeito ansiolítico (PELOW *et al.*, 1985), entre outros achados.

4.6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DEPRESSIVA - TESTE DO NADO FORÇADO

O teste do nado forçado (TNF) é utilizado para a avaliação de protocolos experimentais que desejam desenvolver sintomas do tipo depressivo em animais, bem como para a avaliação de drogas antidepressivas e para a análise da eficácia antidepressiva de novos compostos (CAN *et al.*, 2012). Trata-se de um procedimento experimental que consiste em colocar os animais individualmente em cilindros plásticos (altura- 35 cm; diâmetro- 24 cm), contendo 13,5 cm de água, por um período de 6 min, no qual é registrado o tempo total de imobilidade para cada animal, além da latência para apresentação de tal comportamento, a partir do segundo minuto de teste (PORSOLT; PICHON; JALFRE, 1977). Considera-se como imobilidade quando o animal faz apenas os movimentos mínimos para manter a cabeça fora da água. Um aumento no parâmetro de imobilidade é um indicativo de um comportamento do tipo depressivo. Este teste foi realizado no 45º dia de protocolo, sendo filmado e posteriormente analisado no software *ANY-maze 7.1*.

4.6.4 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO SOCIAL - TESTE DE SOCIABILIDADE DE 3 CÂMARAS

As interações sociais são componentes adaptativos e fundamentais da biologia de diversas espécies de animais. Nos camundongos, o reconhecimento social de animais da mesma espécie é importante para manutenção da hierarquia social e escolha de parceiros para o acasalamento. Uma variedade de desordens neuropsiquiátricas pode trazer prejuízos no comportamento e reconhecimento social, incluindo depressão, autismo, transtorno bipolar e esquizofrenia (KAIDANOVICH-BEILIN *et al.*, 2011). Para a avaliação do comportamento social dos camundongos foi realizado o teste de interação social, adaptado do teste de paradigma de três câmaras originalmente descrito por Crawley (2004). O teste, conhecido como “sociabilidade de Crawley ou preferência por novidade social” tem sido empregado com sucesso para estudar a sociabilidade e memória social em várias linhas de animais. O aparato do teste consiste em uma caixa dimensionada em 60 × 40 x 20 cm e dividida em três compartimentos (câmaras) com as paredes de acrílico transparentes e o chão de acrílico preto. Nas câmaras das extremidades havia uma gaiola de ferro em cada, uma com um animal desconhecido e do mesmo sexo (câmara social) e outra vazia (câmara oposta). O teste baseia-se no princípio da livre escolha do animal experimental em explorar por mais tempo um dos três compartimentos do aparato (câmara central, câmara social e câmara oposta). Sociabilidade, neste caso, é definido como a propensão do animal de passar mais tempo na câmara social comparado ao tempo dispendido na câmara idêntica, porém vazia (MOY *et al.*, 2004).

Este teste foi realizado no 44^o dia de protocolo. Os animais testados foram colocados no compartimento central do aparato, podendo explorar livremente as outras câmaras através de uma pequena abertura de 6 × 6 cm que as conectam. Cada animal teve um tempo de 5 minutos de exploração na caixa e foi medido o tempo que o animal passou em cada uma das três câmaras (VASCONCELOS, 2019). Entre cada animal o aparato foi higienizado com solução de álcool etílico 70%. A porcentagem de interação social foi calculada como: porcentagem de tempo gasto na câmara social dividido pela porcentagem de tempo gasto na câmara social + na câmara oposta.

4.7 EUTANÁSIA E COLETA DO MATERIAL

Após a realização dos testes comportamentais os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina e tiveram os materiais de interesse coletados. Estes foram: áreas cerebrais (pré-frontal, corpo estriado, hipotálamo e hipocampo); fezes intraluminais de diferentes regiões do intestino (jejuno, ceco e cólon) e os tecidos intestinais referentes as mesmas áreas de coleta das fezes. No total foram obtidas 160 amostras cerebrais (40 de cada região), 120 amostras fecais intraluminais (40 de cada região), 120 amostras de tecidos intestinais (40 de cada região), ainda foram obtidas 114 amostras de bolo fecal das coletas realizadas durante o protocolo (T0, T1, T2a).

Para acesso ao intestino, os animais tiveram seu lado ventral expostos e a região abdominal desinfetada com solução de etanol a 70%. Uma incisão longitudinal mediana de 3cm foi feita no abdômen do animal e cuidadosamente a membrana intraperitoneal foi puxada e cortada com a tesoura, expondo os órgãos abdominais. Identificando o estomago, um pequeno corte foi feito a 1cm da sua porção final, na junção com o intestino delgado. De forma similar, um corte foi feito na porção final do intestino, o mais próximo do ânus, obtendo-se todo o tubo intestinal de forma contínua e integra. Com um bisturi, as áreas de interesse foram seccionadas, e o conteúdo fecal intraluminal foi coletado diretamente do interior das alças e armazenado em tubos estéreis individuais (BARRA *et al.*, 2012). Foi-se adicionado aos tubos solução salina na proporção de 1:5 de acordo com a quantidade de fezes coletada, seguido de homogeneização e estocagem a -80°C. Os fragmentos de tecido foram igualmente armazenados em tubos individuais e congelados a -80°C.

Além da coleta realizada diretamente do tecido, ao longo do protocolo, amostras fecais também foram obtidas, porém coletando-se o bolo fecal evacuado pelos animais diretamente dentro de tubos estéreis. As condições de processamento e estocagem foram as mesmas para ambos tipos de amostras. A obtenção dos dois tipos de amostras nos permitiu realizar um comparativo dos mesmos, uma vez que a maioria dos protocolos utiliza o bolo fecal, mesmo este sendo mais propenso a ser de baixa representatividade.

4.8 ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL

4.8.1 EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS FECAIS PELO MÉTODO CTAB2X

O entendimento do papel da microbiota intestinal sobre os organismos depende de uma aquisição de dados genômicos microbianos de alta acurácia e de alta reprodutibilidade. Um passo crítico para isto é a aplicação de uma metodologia de extração de DNA apropriada, desde que interferências nesta etapa podem levar à uma baixa e errônea representatividade bacteriana. A extração de DNA de alta qualidade e em alta quantidade é um passo fundamental na construção de uma biblioteca de DNA genômico (FIEDOROVA *et al.*, 2019). Vários protocolos de extração de DNA têm sido utilizados para amostras fecais, mas problemas como a baixa recuperação de DNA e a presença de inibidores ainda são comumente encontrados. As fezes contêm fibras, micróbios, partículas não digeridas, enzimas, contaminantes, além de outras células do organismo. A remoção desses componentes é de veras difícil, tornando esse tipo de amostra difícil de trabalhar (KUMAR, 2016; YANG, 2020; YU, 2004).

O CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) é um detergente catiônico que tem provado ser um tampão universal para a extração de DNA, servindo sobre vários tipos de amostras, como de sangue, de sêmen, de folículo piloso, de cistos, de algas, de bactérias, de cultura de células, de tecidos vegetais e de tecidos animais (LHODI *et al.*, 1994; THOMAS *et al.*, 1997; SANTOS; ARAUJO, 2017; GUHA *et al.*, 2018; REGINATO *et al.*, 2020). Sobretudo sobre àquelas amostras mais contaminadas e dificilmente lisadas, tais quais como plantas e fungos (INGLIS *et al.*, 2018), sementes (XIN; CHEN, 2012), fezes (KUMAR, 2016; ZHANG, 2006) e até ossos queimados (YE *et al.*, 2004). O método de extração por CTAB, desenvolvido por Doyle & Doyle (1987), aceita diversas adaptações, o que o torna largamente utilizado em diversos protocolos e sobre as mais variadas amostras (MAATY; ORABI, 2019). O CTAB promove a quebra das membranas celulares, liberando o DNA intracelular, e também ajuda na separação de, principalmente, polissacarídeos e ácidos nucleicos, complexando-se às moléculas de DNA (OLIVEIRA *et al.*, 2007). O detergente também é capaz de inibir e desnaturar algumas proteínas (KUMAR; KAUR; SANDHU, 2012). O protocolo de extração com CTAB muitas vezes é associado ao uso de fenol-clorofórmio, o que permite que contaminantes proteicos sejam desnaturados com partição dos mesmos em fases. A fase

orgânica, e/ou a interface entre as fases orgânica e aquosa abriga os contaminantes, enquanto que ácidos nucleicos permanecem na fase aquosa (SANTOS; ARAUJO, 2017). A extração de DNA por CTAB, além de agilizar o processo, por não ser necessário empregar enzimas de degradação de RNA e proteínas, possibilita a esse protocolo maior acessibilidade, menor custo e eficiência metodológica (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

O tampão de extração CTAB2x foi preparado nas seguintes condições: 20Mm de EDTA; 100mM de Tris Hcl pH 8.0; 1,4M de NaCl; 2% de CTAB; 0,2% de 2-mercaptoetanol. O EDTA, por ser um quelante de íons divalentes, como de magnésio e de cálcio, que são necessários para a ação das enzimas degradantes de DNA, foi utilizado para prevenção da ação destas enzimas (TIWARI; JADHAV; GUPTA, 2012). O Tris-HCl pH 8.0 atuou como um agente tamponante, visando a solubilização das membranas lipoproteicas e desnaturação de proteínas, enquanto o DNA manteve-se protegido da ação de enzimas de degradação que atuam em faixa de pH mais baixa. A adição do cloreto de sódio (NaCl) proporcionou ao DNA um ambiente favorável para a extração. O sal contribui com íons positivos que neutralizam a carga negativa do DNA, atuando como um agente redutor e precipitador seletivo de ácidos nucleicos, possibilitando que numerosas moléculas de DNA possam coexistir na solução (GUHA *et al.*, 2018). O 2-mercaptoetanol, adicionado somente antes do uso imediato do tampão, auxilia na degradação de proteínas por redução nas pontes dissulfeto, e tem ação antioxidante, protegendo o DNA de compostos fenólicos que causam oxidações irreversíveis ao DNA (ALBERTS *et al.*, 2011).

Assim, foram distribuídos 250 µL de fezes por amostra em tubos de 2ml contendo esferas de cerâmica, e então adicionados 700 µL de tampão CTAB2x, previamente aquecido a 65°C durante 1 hora, em cada tubo. O aquecimento prévio do tampão apresenta-se necessário pois o CTAB tende a precipitar em temperaturas mais baixas (RENICK, 2018). Os tubos foram então levados ao processo de homogeneização para a ruptura das células bacterianas no aparelho *Omni Bead Ruptor 4* nas configurações de 5 M/s durante 30 segundos. Após o processo de lise, as amostras foram encubadas em banho-maria durante 4 horas sendo homogeneizadas por inversão a cada hora. A incubação pós-lise em temperaturas elevadas favorece a homogeneização das amostras, a solubilização e ação do CTAB, e também inativa enzimas que podem degradar o DNA (DNases). Além disso, também promove a agitação das moléculas, facilitando a ação do detergente em desestabilizar as membranas lipídicas (CDCC

USP, 2019).

Após a incubação, as amostras foram tratadas com 700 μL de Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico seguido de homogeneização por inversão e 10 minutos de centrifugação a 9.800 G para separação de fases. O reagente foi preparado com fenol tamponado pH 8.0, clorofórmio e álcool isoamílico nas proporções de 25:24:1. A extração com o fenol é dependente do pH, este deve ter o pH o mais próximo de 8.0 já que faixas mais baixas de pH deslocam o DNA para a interface na hora da centrifugação. Em pH abaixo de 7.0 o DNA é desnaturado e migra para a fase orgânica. Nesta extração, lipídios, proteínas e a maioria dos polissacarídeos são retidos na fase orgânica inferior, enquanto que o DNA e alguns polissacarídeos são retidos na fase aquosa superior (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

As fases aquosas obtidas (aproximadamente 600 μL por amostra) foram transferidas para novos tubos para realização da quarta etapa, a precipitação e lavagem do DNA em álcool, de forma a garantir a máxima pureza do material. O álcool torna o meio muito hidrofóbico para o DNA, fazendo com que este precipite sobre sua própria estrutura. Então, foram-se adicionados 400 μL de isopropanol a 100% às amostras, seguido de homogeneização, centrifugação a 9.800 G por 10 minutos e descarte de sobrenadante, restando apenas um precipitado esbranquiçado de DNA. O álcool 100% faz com que precipitem muitos sais juntamente com o DNA, além de dificultar sua ressuspensão, por isso utiliza-se uma “lavagem” com álcool 70% gelado para remoção de resíduos remanescentes de sais e de fenóis. Os precipitados obtidos foram “lavados” com a adição de 400 μL de etanol a 70% previamente gelado a 4°C, seguido de centrifugação a 9.800 G por 5 minutos e descarte do sobrenadante. O álcool gelado em solução salina proporciona uma solução heterogênea, fazendo com que as moléculas de DNA se aglutinem, formando ainda mais da massa filamentosa e esbranquiçada, obtendo-se um pellet de DNA mais robusto (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Após lavagem do precipitado, na quinta e última etapa, o DNA foi ressuspendido em 80 μL de água ultra pura estéril, restando apenas o DNA genômico desejado hidratado. As amostras foram então aliquotadas (25 μL) e estocadas a -20°C. Posteriormente, as amostras foram quantificadas nos equipamentos *Qubit fluorometer* e *Nanodrop*, que nos dão sensíveis níveis de concentração de DNA da amostra e avaliação da pureza da amostra, respectivamente. A concentração do DNA foi registrada em ng/ μL , enquanto a pureza foi baseada na razão entre as taxas de densidade óptica (OD) em um comprimento de onda entre 260 nm e 280 nm.

A razão entre as leituras a 260 nm e 280 nm permite saber a pureza do DNA extraído, uma vez que este é altamente absorvido na faixa de 260 nm. Uma razão de 1.8 significa 100% de qualidade; de 1,4 a 2 boa qualidade. A razão inferior a esse valor indica possível contaminação por proteínas, fenóis e outros contaminantes que são absorvidos fortemente na faixa de 280 nm. A razão superior a 2.0 pode indicar contaminação principalmente por RNA. Os valores almejados estão geralmente entre 1.8 e 2.2, um pouco acima de seus respectivos valores de 260/280. Um pouco menos utilizada, ou menos conhecida, a razão 260/230 pode indicar contaminação com diversos compostos: fenóis, guanidina, *beads* de purificação, carboidratos e proteínas (MARQUES *et al.*, 2017).

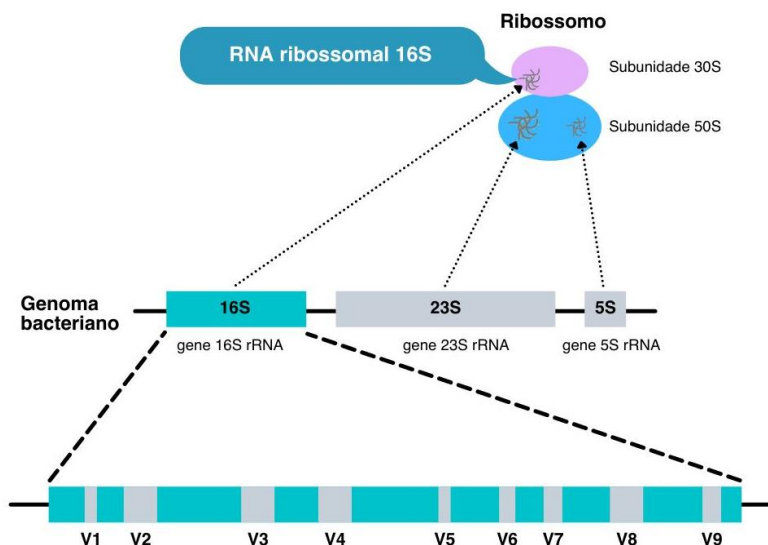
No total, 114 amostras foram extraídas, sendo estas compostas por 39 amostras colhidas na primeira coleta (T0), 37 amostras colhidas na terceira coleta (T2a) e 40 amostras colhidas diretamente do lúmen do cólon (T2b). Das 114 amostras extraídas, 90 amostras foram selecionadas para serem amplificadas com base na concentração e pureza do DNA extraído. Foram selecionadas 24 amostras da primeira coleta (T0), na qual todos os animais se apresentavam nas mesmas condições, antes do início do protocolo, sendo, portanto, definida como um ponto de controle; 32 amostras da terceira coleta (T2a); e 34 amostras da coleta intraluminal do cólon (T2b).

4.8.2 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 16S E SEQUENCIAMENTO

A partir das amostras de DNA obtidas foram realizadas ampliações de DNA de procarioto da porção gênica 16S do DNA ribossômico nuclear, utilizando-se o método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, Polymerase Chain Reaction). Os ribossomos bacterianos, em sua menor subunidade, carregam três tipos de rRNA codificados em genes organizados em operons e separados por sequências intergênicas, 16s, 23s e 5s (SILVA, 2002). O gene 16s, altamente conservado entre procariotos, funciona como um marcador taxonômico, ajudando a fornecer estimativas de diversidade, distância evolucionária e abundância relativa de bactérias (CHAUDHARY *et al.*, 2015). Este gene é composto por nove regiões hipervariáveis (V1 a V9), que divergiram durante a evolução, as quais são flanqueadas por regiões altamente conservadas (CLARRIDGE, 2004). Técnicas de biologia molecular desenvolveram primers para flanquear as regiões conservadas e realizar a amplificação dessas regiões variáveis. A similaridade ou diversidade das regiões hipervariáveis pode ser utilizada para discriminar taxonomicamente diferentes filos, ordens, classes, gêneros e espécies de

bactérias (TAKAYASU *et al.*, 2019).

Figura 4. 16s RNA e regiões hipervariáveis.



Fonte: Adaptado de Journal of UOEH (2016) **38**, p. 225

Foram utilizados os seguintes *primers* para a amplificação das regiões hipervariáveis V3 e V4:

Tabela 3. *Primers* utilizados para a amplificação gênica.

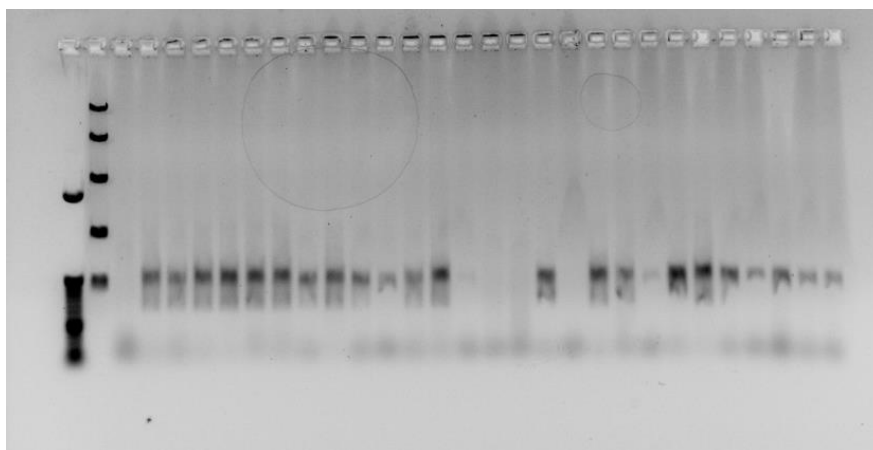
Primer direto	5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGC AG
Primer reverso	5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATC TAATCC

Fonte: Próprio autor com base nos *primers* de KLINDWORTH *et al.*, 2013.

A reação de amplificação foi composta por 5 µL de cada primer (na concentração de 1 µM), 2,5 µL do DNA (na concentração de 5ng/ µL) e 12,5 µL de mastermix (*Platinum*

SuperFi II Green PCR Master mix – Invitrogen). O termociclador utilizado para amplificação do DNA foi o *Mastercycler X50s (Eppendorf)*, com um ciclo programado de 95° C por 3 minutos, seguido de 25 ciclos de 95° C por 30 segundos, 55° C por 30 segundos e 72° C por 30 segundos, sendo finalizado com um ciclo de 72° C por 5 minutos e retenção a 4° C. Os amplicons resultantes foram corridos em gel de agarose 0,8% tampão TAE (Trisacetato 40mM e EDTA 1mM) e visualizados no equipamento *iBright 1500* para a identificação das bandas de amplificação. Seis das amostras amplificadas foram selecionadas para serem analisadas no aparelho *TapeStation 4150 (Agilent)* para confirmar a presença de amplicons de aproximadamente 550 pares de bases (pb), validando a amplificação.

Figura 5. Gel de eletroforese do produto de amplificação (aprox. 550pb).



Fonte: Próprio autor.

Após a PCR foi realizada uma primeira limpeza nas amostras com *beads* magnéticas (*ProNex Size-Selective DNA Purification System – Promega*) e etanol 80% fresco. Após a lavagem as amostras foram indexadas com o reagente *Nextera XT Index Kit v2 Set A – Illumina*, usando o programa no termociclador de 95° C por 3 minutos, seguido de 8 ciclos de 95° C por 30 segundos, 55° C por 30 segundos e 72° C por 30 segundos, sendo finalizado com um ciclo de 72° C por 5 minutos e retenção a 4° C. Após a indexação uma segunda lavagem foi realizada com *beads* magnéticas (*ProNex Size-Selective DNA Purification System – Promega*) e etanol 80% fresco. Das bibliotecas obtidas, seis amostras foram analisadas no aparelho *TapeStation 4150 (Agilent)* para a confirmação de sequências de aproximadamente 630 pares de bases e validação da inserção dos adaptadores.

As bibliotecas geradas foram então quantificadas utilizando o *Qubit dsDNA Assay HS*, e das 90 amostras amplificadas, 72 foram selecionadas, através do critério concentração, para

serem sequenciadas. As amostras selecionadas foram normalizadas para a concentração de 5ng/μL e seguidamente diluídas em Tris pH 8.5 (10 mM) para a concentração de 4 nM. Foi-se aliqotado 5 μl do DNA diluído de cada biblioteca em um tubo, agrupando-as em um “*pool*”. Uma amostra de 5 μl foi retirada do *pool* de bibliotecas para o processo de desnaturação com NaOH, clusterização com tampões de hibridização e diluição para a concentração de 10 pM. A amostra foi carregada no cartucho *Miseq Reagent Kit v3* (600 ciclos) – *Illumina* juntamente com o reagente *PhiX Control Kit v3* (FC-110-3001) e sequenciada no equipamento de nova geração *Illumina Miseq* da Instituição Oswaldo Cruz (Fiocruz Ceará).

4.8.3 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos do sequenciamento (sequências FASTQ) foram analisados através do *pipeline* DADA 2 para a inferência de sequências ASV (do inglês Amplicon Sequence Variant), sequências biológicas únicas e exatas entre todas que estão representadas nos reads obtidos de cada amostra (CALLAHAN *et al.*, 2016). A partir dessas sequências, a classificação taxonômica foi realizada através do *pipeline* TAG.ME, um método escalonável de alinhamento baseado em marcadores genéticos (PIRES *et al.*, 2018). A alfa diversidade, ou diversidade local, representa a diversidade taxonômica dentro de uma mesma população e foi calculada usando os índices de Shannon-Wiener e Simpson. A riqueza de espécies foi mensurada pelo estimador de riqueza Chao1. Este index além de estimar riqueza, também serve como uma medida qualitativa de alfa diversidade (PREHN-KRISTENSEN *et al.*, 2018). A beta diversidade, que compara a dissimilaridade ou distância das amostras em si, foi medida através do índice de divergência Jensen-Shannon e representada através da técnica de redução de dimensionalidade PCoA (Análise de Coordenadas Principais). Estes índices utilizam fórmulas matemáticas para medir a diversidade microbiana das amostras estudadas. São baseados nas abundâncias proporcionais dos táxons, sendo as medidas de diversidade mais utilizadas em ecologia (BAIMA, 2020). As análises estatísticas e a geração de gráficos foram realizadas através do software R.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

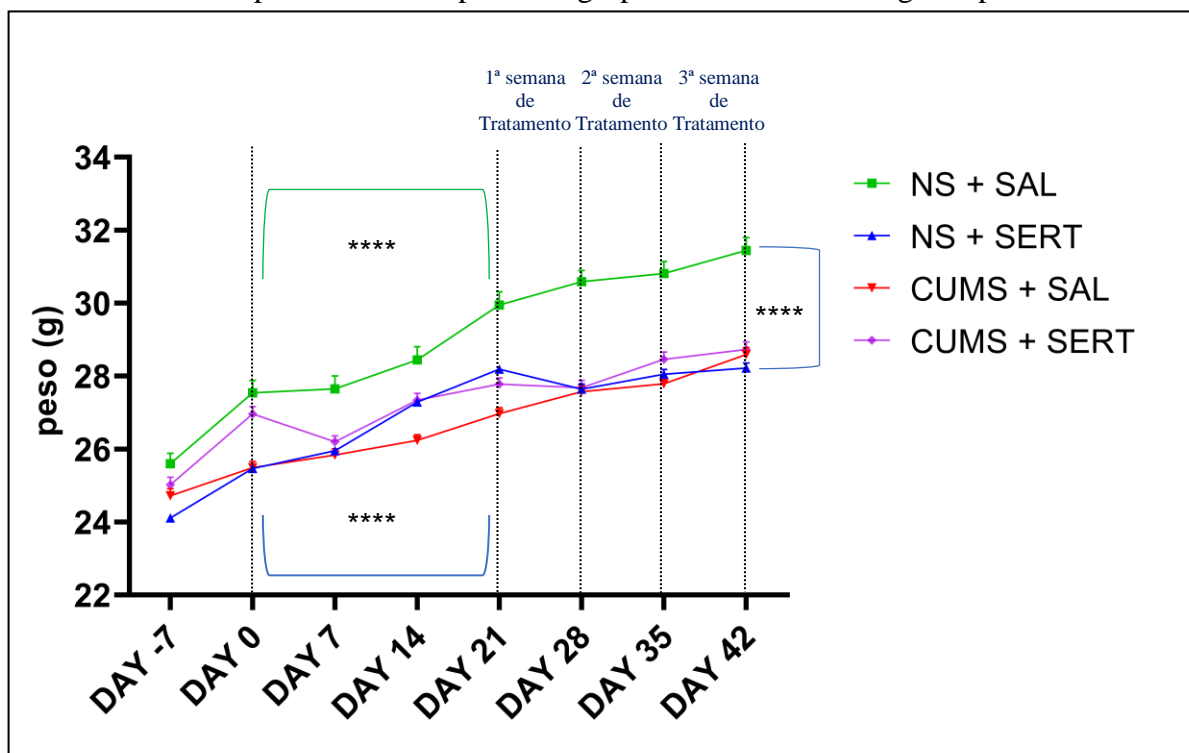
Os resultados dos testes comportamentais, bem como da avaliação da pelagem e do peso dos animais foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). Os dados foram analisados e os gráficos gerados através do software *GraphPad Prism 9.0*. Para a comparação de médias entre dois grupos distintos foi utilizado o Teste de Mann-Whitney, já para comparação de mais de dois grupos foi utilizado ANOVA de duas vias, seguindo do Teste de Tukey para comparações múltiplas. Em todas as análises, foi considerado estatisticamente significativo, valores de $p < 0,05$. Os resultados do sequenciamento foram analisados através do software R. Para a comparação dos índices de beta diversidade entre os grupos foi utilizado o teste Permanova, enquanto para os índices de alfa diversidade foi utilizado o teste de Wilcoxon. Em todas as análises, foi considerado estatisticamente significativo, valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 PONDERAGEM

O acompanhamento do peso dos animais foi realizado semanalmente ao longo de todo o protocolo. Nota-se que ao longo das três primeiras semanas de protocolo, os animais não estressados tiveram um significativo aumento de peso em relação ao dia 0 ($p < 0,001$), enquanto os animais cronicamente estressados não apresentaram ganho de peso significativo. Após o tratamento, os animais não estressados e que receberam salina terminaram o protocolo com uma média de peso significativamente maior em relação aos demais três grupos ($p < 0,001$), revelando uma interferência do fator desafio e do fator tratamento sobre o peso dos animais. Apesar disso, não foi vista diferença significativa nas médias de peso entre os grupos CUMS + SAL e CUMS + SERT.

Gráfico 1. Acompanhamento do peso dos grupos de animais ao longo do protocolo.

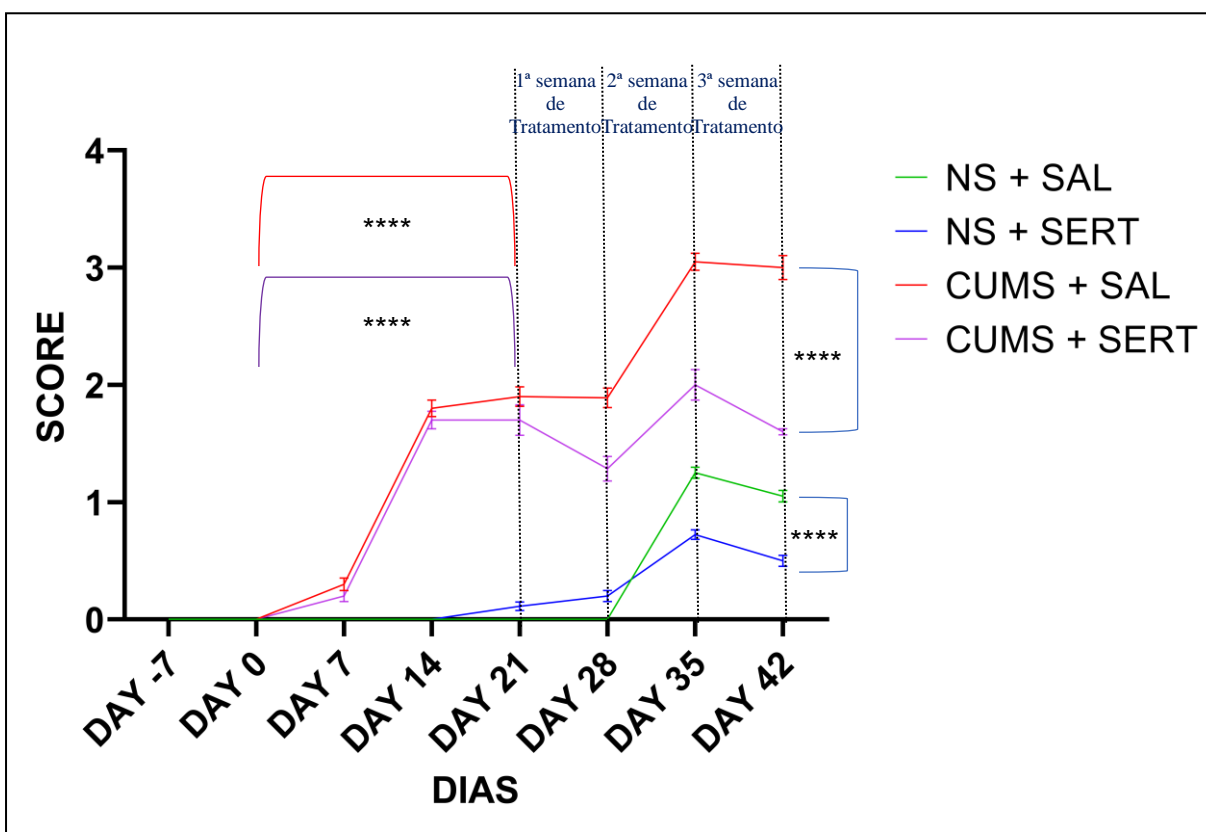


As linhas representam a média do peso (gramas) \pm E.P.M (n = 20). A análise dos dados foi feita através de ANOVA de duas vias e do Teste de Tukey para comparações múltiplas. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Abreviações: NS = não estressado; CUMS = cronicamente estressados; SAL = Salina; SERT = Sertralina.

5.2 AVALIAÇÃO DA PELAGEM

O acompanhamento da pontuação de danos a pelagem dos animais foi realizado semanalmente ao longo de todo o protocolo. Os animais expostos ao estresse crônico moderado imprevisível começaram a apresentar significantes alterações na pelagem em relação aos grupos controle a partir da segunda semana de estresse ($p < 0,001$), enquanto os animais não estressados só começaram a apresentar algum prejuízo na pelagem na quinta semana de protocolo (todos os grupos tiveram um pico na pontuação nesta semana). Os animais estressados terminaram o protocolo com um score de pelagem significativamente maior em relação aqueles que não passaram pelo desafio ($p < 0,0001$). O tratamento dos animais revelou uma capacidade da sertralina em prevenir os danos à pelagem ocasionados pelo estresse ($p < 0,05$).

Gráfico 2. Score de pelagem dos grupos de animais ao longo do protocolo.



As linhas representam a média de pontuação \pm E.P.M ($n = 20$). A análise dos dados foi feita através de ANOVA de duas vias e do Teste de Tukey para comparações múltiplas. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Abreviações: NS = não estressado; CUMS = cronicamente estressados; SAL = Salina; SERT = Sertralina.

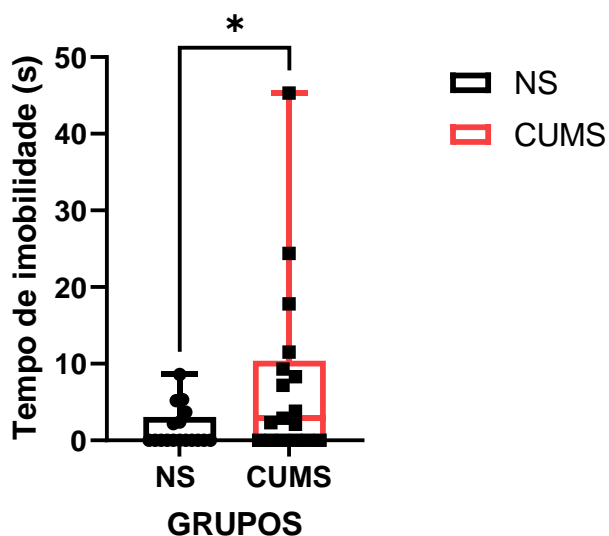
5.3 RESULTADOS DAS AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS

5.3.1 TESTE DO NADO FORÇADO

5.3.1.1 NADO FORÇADO DIA 21

O Teste do Nado Forçado realizado com os grupos de animais no 21º dia do protocolo demonstrou que o grupo cronicamente estressado apresentou um tempo maior de imobilidade em relação ao grupo controle ($p = 0,0420$).

Gráfico 3. Efeito do Estresse Crônico Moderado Imprevisível sobre o comportamento de imobilidade no Teste do Nado Forçado (dia 21).

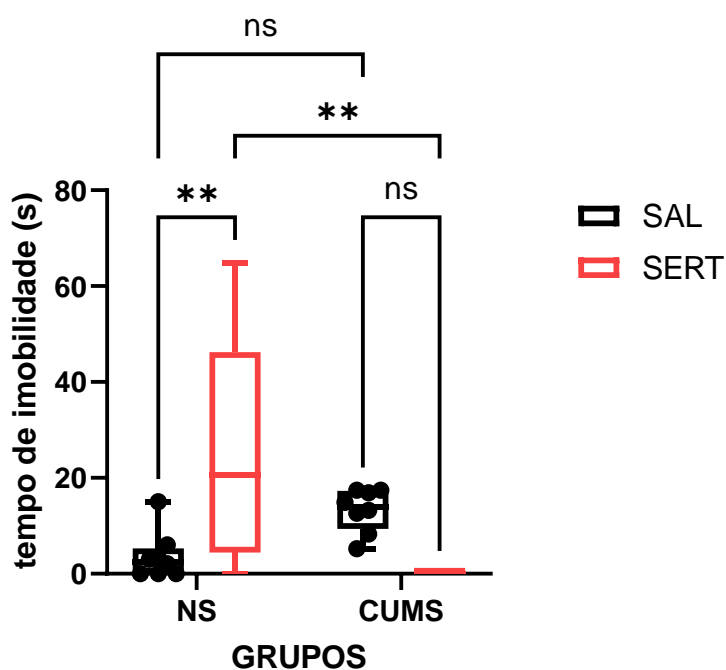


Boxplot com as médias de tempo (segundos) e variação mínima à máxima ($n = 17$ de 20 animais/grupo). A análise dos dados foi feita através do Teste de Mann-Whitney. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Abreviações: NS = não estressado; CUMS = cronicamente estressados.

5.3.1.2 NADO FORÇADO D45

Os resultados do Teste do Nado Forçado realizado no dia 45 do protocolo revelaram uma significativa interação de duas vias entre os fatores “desafio” e “tratamento” sobre o parâmetro tempo de imobilidade [$F(1, 28) = 9.526$; $p = 0,004$]. Apesar disso não foi mais vista diferença significativa no parâmetro entre os grupos NS + SAL e CUMS + SAL como havia sido observado no dia 21. Já a administração de Sertralina demonstrou-se capaz de aumentar significativamente o tempo de imobilidade nos animais controle ($p = 0,008$), enquanto tendeu a zerar o tempo de imobilidade dos animais estressados (média = 0), apesar de a análise estatística não revelar uma diferença significativa.

Gráfico 4. Efeitos dos fatores “desafio” e “tratamento” sobre o comportamento de imobilidade no Teste do Nado Forçado (dia 45).

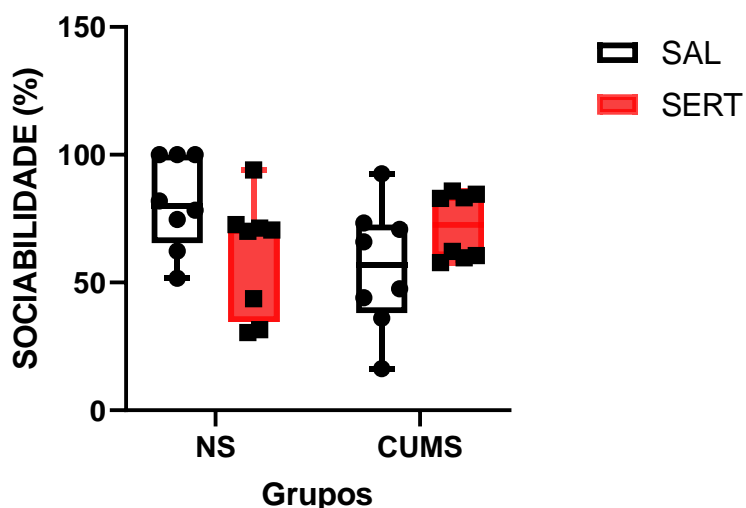


Boxplot com as médias de tempo (segundos) e variação mínima à máxima ($n = 8$ de 10 animais/grupo). A análise dos dados foi feita através de ANOVA de duas vias e do Teste de Tukey para comparações múltiplas. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Abreviações: NS = não estressado; CUMS = cronicamente estressados; SAL = Salina; SERT = Sertralina.

5.3.2 TESTE DE INTERAÇÃO SOCIAL

Tendo em consideração o comportamento de sociabilidade ou interação social, a análise estatística revelou que os fatores “desafio” e “tratamento” não alteraram de forma significativa o parâmetro avaliado. Porém uma significativa interação de duas vias entre os fatores “desafio” e “tratamento” foi encontrada [$F(1, 28) = 6.753$; $p = 0,0148$].

Gráfico 5. Efeitos dos fatores “desafio” e “tratamento” sobre o comportamento social dos animais.

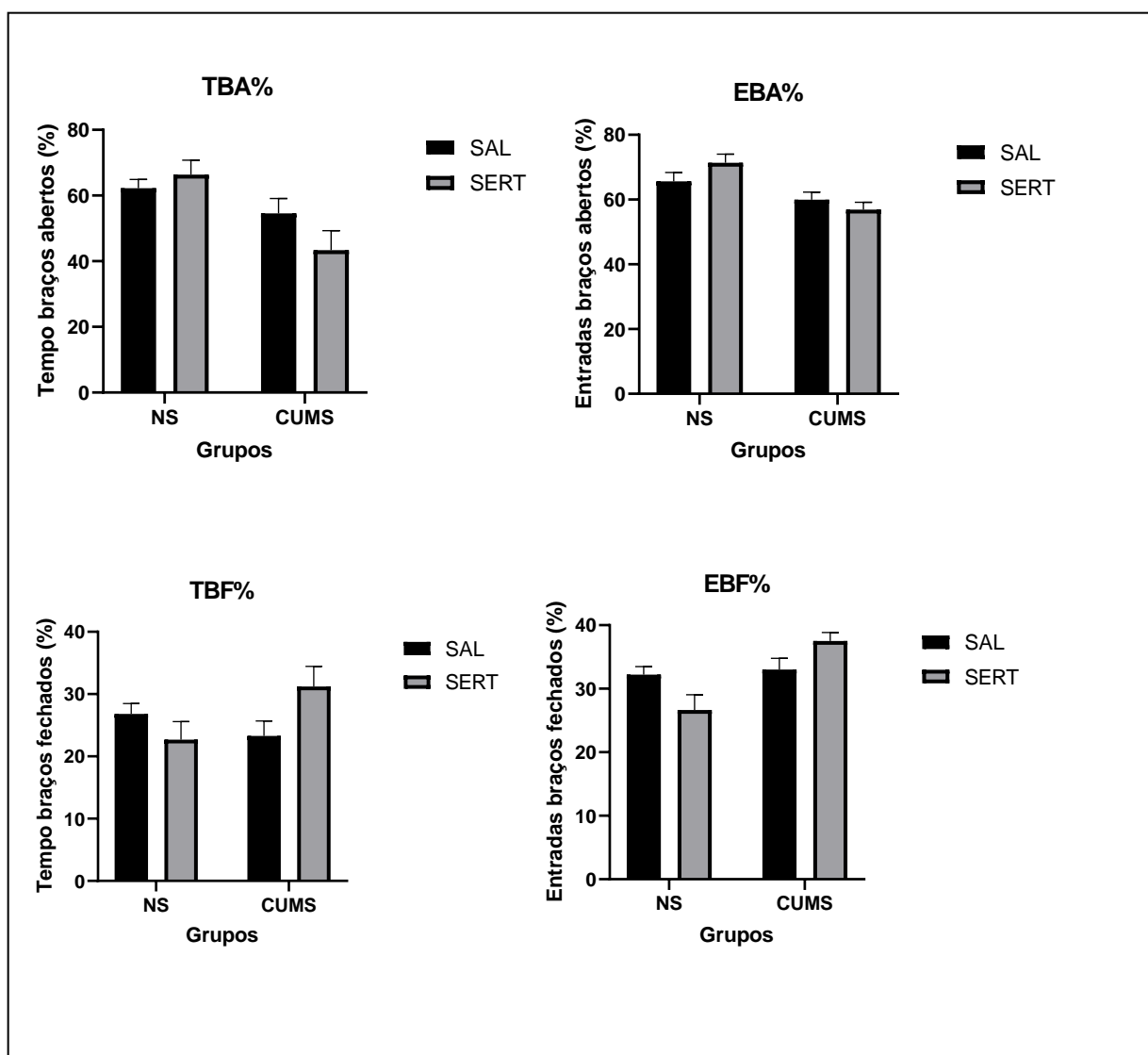


Boxplot com as médias de sociabilidade (%) e variação mínima à máxima ($n = 8$ de 10 animais/grupo). A análise dos dados foi feita através de ANOVA de duas vias e do Teste de Tukey para comparações múltiplas. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Abreviações: NS = não estressado; CUMS = cronicamente estressados; SAL = Salina; SERT = Sertralina.

5.3.3 TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

No Teste do Labirinto em Cruz Elevado as análises estatísticas demonstraram que não houveram alterações significativas entre os grupos de animais nos quatro parâmetros avaliados, nem pelo fator “desafio” nem pelo fator “tratamento”.

Gráfico 6. Efeitos dos fatores “desafio” e “tratamento” sobre o comportamento de ansiedade no Teste do Labirinto em Cruz Elevado.

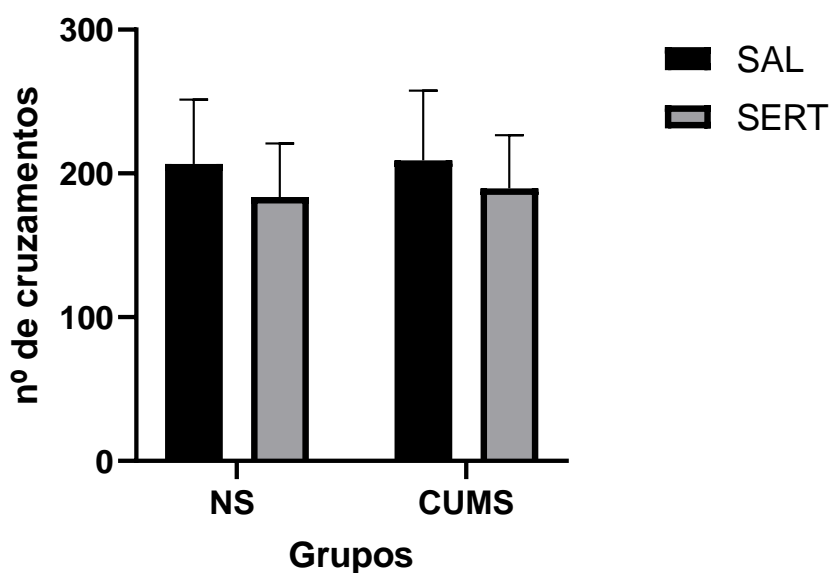


As barras representam a média \pm E.P.M (n = 10). A análise dos resultados foi feita através de ANOVA de duas vias e do Teste de Tukey para comparações múltiplas. Abreviações: NS = não estressado; CUMS = cronicamente estressados; SAL = Salina; SERT = Sertralina.

5.3.4 TESTE DO CAMPO ABERTO

No que concerne ao teste de campo aberto, o parâmetro de atividade locomotora horizontal foi mensurado pelo número de cruzamentos com quatro patas nos quadrantes do aparato, não sendo verificada nenhuma alteração significativa na atividade locomotora dos animais, nem pelo fator “desafio” nem pelo fator “tratamento”.

Gráfico 7. Número de cruzamentos com quatro patas no Teste do Campo Aberto.



As barras representam a média do nº de cruzamentos \pm E.P.M (n = 10). A análise dos dados foi feita através de ANOVA de duas vias e do Teste de Tukey para comparações múltiplas. Abreviações: NS = não estressado; CUMS = cronicamente estressados; SAL = Salina; SERT = Sertralina.

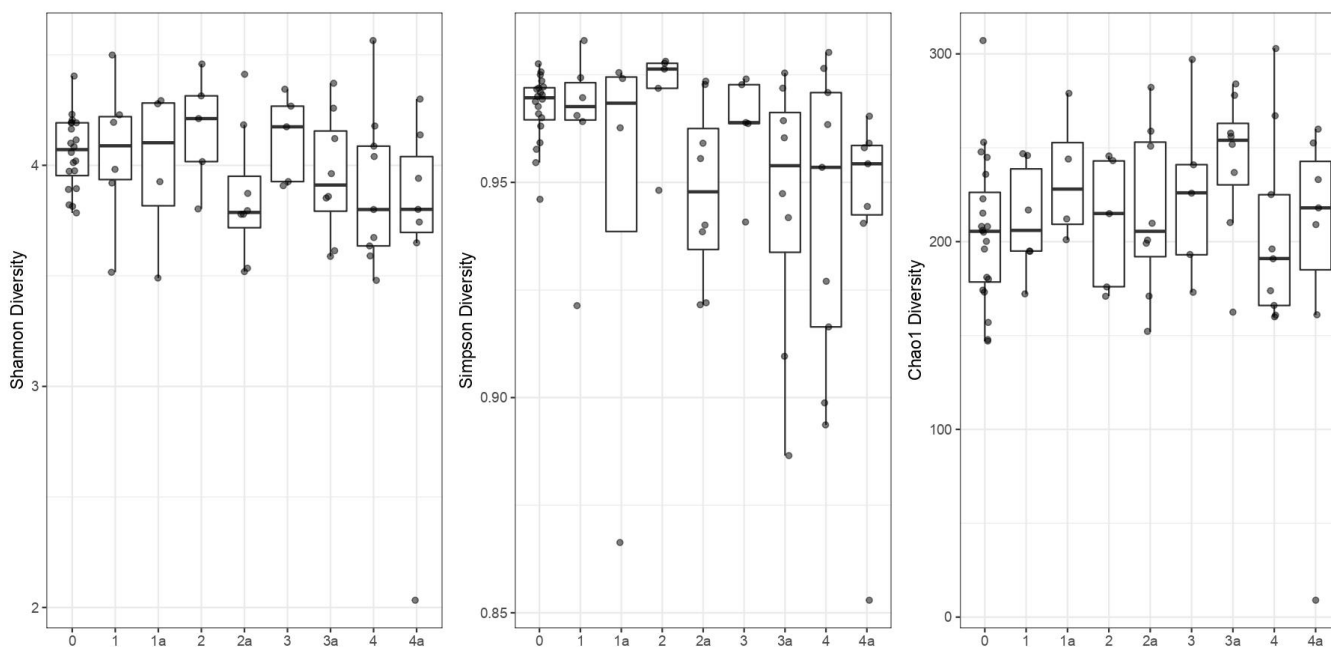
5.4 RESULTADOS PRELIMINARES DO SEQUENCIAMENTO

Para interpretação dos resultados do sequenciamento, as amostras foram divididas em nove grupos experimentais (0, 1, 1a, 2, 2a, 3, 3a, 4 e 4a). O grupo 0 é composto por amostras da coleta de fezes *baseline* (T0), ocorrida antes do início do protocolo (n = 20). Os grupos 1 (n = 6), 2 (n = 5), 3 (n = 5) e 4 (n = 9) representam respectivamente as amostras de bolo fecal colhidas no final do protocolo após defecação espontânea dos grupos NS + SAL, NS + SERT, CUMS + SAL e CUMS + SERT. Os grupos 1a (n = 4), 2a (n = 8), 3a (n = 8) e 4a (n = 7) representam respectivamente os mesmos grupos, porém são as amostras de fezes colhidas diretamente do cólon dos animais.

5.4.1 ANÁLISES DE ALFA DIVERSIDADE

As análises estatísticas revelaram que não houve diferenças significativas quanto aos índices de alfa diversidade estudados (Shannon-Wiener, Simpson e Chao1) entre os grupos experimentais.

Gráfico 8. Resultados dos índices de alfa diversidade.

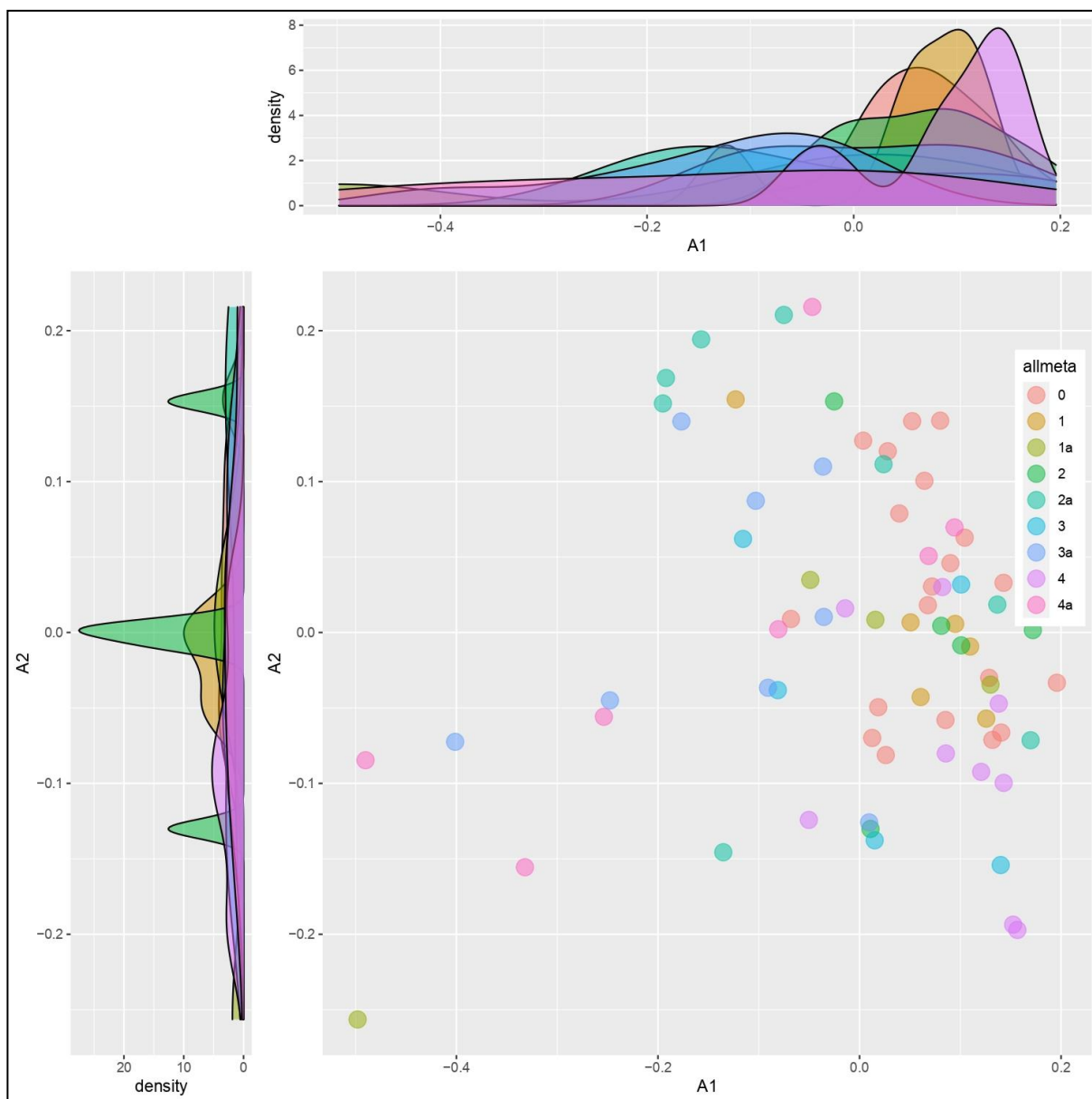


Boxplot com os índices de alfa diversidade. Abreviações: 0 = baseline (T0); 1 = NS + SAL (bolo fecal); 1a = NS + SAL (fezes do cólon); 2 = NS + SERT (bolo fecal); 2a = NS + SERT (fezes do cólon); 3 = CUMS + SAL (bolo fecal); 3a = CUMS + SAL (fezes do cólon); 4 = CUMS + SERT (bolo fecal); 4a = CUMS + SERT (fezes do cólon).

5.4.2 ANÁLISE DE COORDENADAS PRINCIPAIS (PCoA)

As análises estatísticas revelaram que não houve diferenças significativas quanto ao índice de beta diversidade entre os grupos experimentais. Este foi representado através da técnica de redução de dimensionalidade PCoA (Análise de Coordenadas Principais).

Gráfico 9. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) dos grupos experimentais.



PCoA com base no índice de divergência de Jensen-Shannon. Abreviações: 0 = baseline (T0); 1 = NS + SAL (bolo fecal); 1a = NS + SAL (fezes do cólon); 2 = NS + SERT (bolo fecal); 2a = NS + SERT (fezes do cólon); 3 = CUMS + SAL (bolo fecal); 3a = CUMS + SAL (fezes do cólon); 4 = CUMS + SERT (bolo fecal); 4a = CUMS + SERT (fezes do cólon).

6. DISCUSSÃO

A interação entre o intestino e o sistema nervoso pôde ser observada desde há muito tempo. No século XIX, em 1872, Charles Darwin em seu livro “A Expressão das Emoções em Homens e Animais” destacou que “A maneira pela qual as secreções do canal alimentar e outros órgãos determinados... são afetados por fortes emoções, é outro excelente exemplo da ação direta do sensorio nesses órgãos, independentemente da vontade ou de qualquer hábito associado” (DARWIN, 1872 *apud* BANKS, 2008). Há poucas décadas os mecanismos e as funcionalidades dessas interações começaram a ser descritos, e indicam forte influência das bactérias intestinais nesses processos. Os modelos animais foram fundamentais para muitas dessas elucidações; o uso de animais isentos de micróbios por exemplo possibilitou amplas descobertas sobre a influência da microbiota intestinal no desenvolvimento de diversos sistemas dos organismos. Os modelos animais trazem ainda muitas possibilidades de investigação dessas interações, permitindo o estudo da microbiota intestinal em vários modelos de doenças, desencadeados através de diferentes mecanismos, o que favorece uma ampla investigação de mecanismos mais específicos. A realização de estudos de forma experimentalmente bem controlada também proporciona um maior entendimento de mecanismos cada vez mais específicos. A possibilidade de estudos da interação de diversas moléculas e substâncias com o Trato Gastrointestinal e a microbiota associada também se tornam muito mais amplos com o uso de modelos animais. Não podemos deixar de citar a possibilidade da utilização de metodologias que seriam complexas e invasivas para seres humanos, como o transplante de fezes, a realização de biópsias de diversos órgãos e a obtenção dos tecidos cerebrais e intestinais em sua integral constituição.

Várias desordens tem sido associadas a modificações no sistema microbiota-intestino-cérebro, incluindo transtornos de humor como a depressão. A microbiota, por ser parte fundamental da metabolização de fármacos, também parece estar associada com a eficácia dos medicamentos utilizados no tratamento desta desordem. Apesar das inúmeras evidências sobre a relação da composição da microbiota intestinal com doenças como a depressão e ansiedade existirem, os achados tanto em animais quanto em humanos continuam inconsistentes e com baixa reprodutibilidade (BARANDOUZI et al., 2020). Por exemplo, enquanto alguns estudos encontram alterações de diversidade entre indivíduos portadores de Transtorno Depressivo Maior (TDM), como no caso de Jiang e colaboradores (2015), vários outros estudos não

detectam as mesmas alterações (BARANDOUZI et al., 2020). Observa-se também uma grande inconsistência entre os achados de abundância relativa a nível de filo. Enquanto alguns estudos detectam um aumento da abundância do filo Firmicutes e uma diminuição da abundância do filo Bacteroidetes em portadores de TDM, outros encontram uma menor abundância de Firmicutes (BARANDOUZI et al., 2020; SHEN et al., 2021). Os resultados de abundância a nível de gênero também parecem variados. Nos modelos animais, os achados também se apresentam variados. O trabalho de Huang e colaboradores (2022) por exemplo utilizou um protocolo de ECMI de seis semanas em ratos, não verificando diferenças significativas na abundância e na diversidade da microbiota intestinal dos animais em relação ao grupo controle, apesar de os animais apresentarem inúmeras alterações no SNC e TGI. Já Zhang e colaboradores (2021) encontraram modificações na riqueza e diversidade da microbiota intestinal de ratos submetidos a um mais intenso e mais longo protocolo de ECMI, sendo verificada essas alterações na oitava semana. Já na 15^a semana, não foi mais vista diferença significativa no índice de alfa diversidade entre os animais estressados e os animais controle, somente quanto ao índice de beta diversidade.

Muitas das dissimilaridades dependem de fatores como o delineamento experimental, a dieta dos animais, a natureza, o tempo e a intensidade dos protocolos de indução, a coleta de amostras, o método de extração de DNA fecal, e as técnicas de sequenciamento e de bioinformática utilizadas para análise da microbiota (HUANG et al., 2022). Torna-se então de grande importância a busca pela padronização de modelos animais para estudo do eixo microbiota-intestino-cérebro, de forma a melhorar a reprodutibilidade dos trabalhos e garantir resultados mais consistentes e representativos.

O presente trabalho propôs a padronização de um modelo animal de depressão para estudos dessa natureza. O trabalho procurou empregar animais e metodologias que permitissem a avaliação da microbiota intestinal com o mínimo de interferências de outros fatores que não o estresse crônico moderado imprevisível. Por exemplo, a linhagem de camundongos escolhida para o protocolo experimental foi a linhagem *Swiss* (mundialmente a mais utilizada e classificada como “*outbred*” - geneticamente variável e heterozigota), enquanto muitos outros protocolos utilizam por exemplo camundongos BALB/c e C57BL/6 (LIU et al, 2021; UFSC, 2022). Estes, apesar de demonstrarem ser mais suscetíveis a indução de comportamentos do tipo depressivo através de estresse crônico, são classificados como

“*inbred*” - geneticamente definidos e homozigotos (JUNG *et al.*, 2014; SHOJI; MIYAKAWA, 2019; MONTEIRO *et al.*, 2015;). Dada a grande relação da microbiota intestinal com a genética do hospedeiro, achou-se melhor não utilizar animais geneticamente definidos. Para a indução de depressão por exemplo, foi preferível o modelo de estresse crônico moderado imprevisível (considerado o de maior potencial translacional) ao modelo de administração de corticosterona, de forma a evitar possíveis impactos diretos da substância sobre o eixo microbiota-intestino-cérebro. Eventos indutores de estresse como a privação de comida também foram evitados. Testes comportamentais também foram descartados para evitar a ingestão de substâncias específicas pelos animais, como o teste de preferência por sacarose ou teste “*splash*”. Vale ainda ressaltar que o experimento foi realizado com animais SPF (*specific pathogen free*) propiciando o estudo em condições ambientais mais controladas. Já para o tratamento dos animais foi escolhida uma substância com grande potencial de ter ação sobre as bactérias intestinais, a Sertralina. A escolha se baseou no intuito de avaliar possíveis modificações na microbiota intestinal mediadas pelo uso crônico deste antidepressivo.

Neste trabalho, foi proposto um protocolo de Estresse Crônico Moderado Imprevisível de seis semanas associado a um tratamento oral com Sertralina (10mg/Kg) durante as 3 últimas semanas de protocolo. Ao longo de todo o protocolo uma avaliação fenotípica dos animais foi realizada (acompanhamento do peso e da pelagem). Os resultados demonstraram influências significativas dos fatores “desafio” e “tratamento” tanto sobre o ganho de peso dos animais quanto sobre a danificação da pelagem. O protocolo de ECMI ocasionou um menor ganho de peso dos animais ao longo do tempo, concordando com achados encontrados na literatura (MONTEIRO *et al.*, 2015). O uso da Sertralina também pareceu influenciar o ganho de peso, visto que os animais controles tratados com salina apresentaram um ganho de peso muito mais significativo do que os animais tratados com a droga. O achado também é comum na literatura, tendo ainda estudos investigado possíveis mecanismos específicos envolvidos na inibição do ganho de peso, pensando-se sobre possíveis alterações nos mecanismos metabólicos e no controle de apetite, como demonstrado em estudo animal por Silverstein-Metzler e colaboradores (2016). De fato, estudos em humanos indicam que a Sertralina, entre os diversos antidepressivos, apresenta-se como a que causa menor percentual de ganho de peso (GAFOOR; BUTH; GULLIFORD, 2018). Quanto a avaliação da pelagem, o protocolo de ECMI demonstrou-se capaz de induzir significativos prejuízos sobre o parâmetro, assim como outros protocolos (NOLLET, 2021). O tratamento com Sertralina foi capaz de reverter

os danos ocasionados na pelagem tanto nos animais estressados quanto nos animais controles.

O protocolo de Estresse Crônico Moderado Imprevisível proposto demonstrou-se capaz de ocasionar alterações comportamentais em camundongos *Swiss* adultos com 21 dias de estresse, através do aumento do comportamento de imobilidade no TNF (fenótipo depressivo). Já com 44 dias de protocolo a modificação sobre o parâmetro de imobilidade pareceu atenuada, bem como não foram vistas alterações nos comportamentos locomotor, ansioso e social dos animais. De fato, os estudos apontam que outras linhagens de camundongos são mais suscetíveis ao estresse crônico (JUNG *et al.*, 2014; MONTEIRO *et al.*, 2015; SHOJI; MIYAKAWA, 2019). Quanto a análise preliminar da microbiota intestinal o ECMI também não se demonstrou capaz de alterar os índices de diversidade microbiana. Estipula-se que um protocolo mais longo e/ou intenso seja necessário.

O tratamento oral de 3 semanas com Sertralina (10 mg/kg) foi capaz de reverter os danos à pelagem ocasionados sobre os animais e tendeu a zerar o comportamento de imobilidade nos animais estressados, apesar de a média entre os grupos CUMS + SAL e CUMS + SERT não ser estatisticamente significativa. Na contramão, o tratamento pareceu estimular o comportamento depressivo em animais saudáveis, levando a pensar em possíveis efeitos deletérios sobre a saúde do hospedeiro. O tratamento também não se demonstrou capaz de ocasionar mudanças significativas nos índices de diversidade da microbiota intestinal dos animais. Já o trabalho de Neufeld (2019) que tratou animais oralmente por 14 dias com a dose de 6 mg/kg de Sertralina detectou uma significativa diminuição da alfa diversidade microbiana dos animais expostos a substância, enquanto alterações de beta diversidade não foram vistas. Nesse trabalho, o tratamento foi ainda feito em duas condições: em animais vagotomizados e animais não vagotomizados; não sendo detectadas diferenças significativas na diversidade em relação a este fator, indicando que as possíveis modificações ocasionadas na microbiota intestinal pela Sertralina não são dependentes do nervo vago. Muito ainda se tem a investigar sobre o efeito dos antidepressivos sobre a microbiota intestinal e suas repercussões sobre o eixo intestino-cérebro, bem como sobre a efetividade do tratamento e sobre a saúde do hospedeiro. Alterações na microbiota intestinal mediadas pela ação destes medicamentos, poderiam teoricamente interagir positivamente ou negativamente com a eficácia da droga, dependendo de qual grupo de microorganismos foi avantajado ou desvantajado pela pressão seletiva. Entretanto, para os ISRS afetarem a diversidade da

microbiota intestinal, seria necessário o alcance destes no lúmen intestinal em concentrações suficientes.

O trabalho apresentou limitações, como por exemplo o não processamento de todos os tipos de amostras obtidos. Apenas amostras fecais foram processadas (ainda apenas uma parte delas). Apesar disso, amostras cerebrais e intestinais permanecem estocadas existindo a possibilidade de adicionais investigações. O trabalho de Huang e colaboradores (2022) por exemplo utilizou um protocolo de ECMI de seis semanas em ratos, não verificando diferenças significativas na abundância e na diversidade da microbiota intestinal dos animais em relação ao grupo controle, apesar de os animais apresentarem comportamentos do tipo depressivo e ansioso nos testes comportamentais, modificações morfológicas no hipocampo e cólon, queda da concentração de neurotransmissores (serotonina, dopamina e noradrenalina) no soro e no cérebro, e o aumento de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1b, IL-18 e TNF- α) no soro, cérebro e cólon. O estudo detectou também uma positiva correlação na presença de todas as citocinas citadas entre o cérebro e o cólon. Outra questão que poderia ser analisada por exemplo, seria a investigação do impacto do protocolo sobre a diversidade e abundância da microbiota aderida a mucosa intestinal e não sobre a microbiota fecal. Estudos demonstram que o uso do tecido intestinal em relação a amostras de fezes coletadas de diferentes formas, fornecem resultados que trazem maiores índices de diversidade (SUN et al., 2021).

Por fim, uma contínua busca pela padronização de modelos animais para estudos dessa natureza apresenta-se necessária, de forma a melhorar a reprodutibilidade dos trabalhos e garantir resultados mais consistentes e representativos. Lembramos que se prevê que estudos sobre a composição da microbiota intestinal tornara-se rotina para o desenvolvimento de drogas visando o tratamento dos transtornos psiquiátricos (CHAIT, 2020), reforçando a necessidade de modelos padronizados. Ainda, sabendo-se do potencial antibacteriano apresentado pelos medicamentos antidepressivos e da sua forma de consumo oral, torna-se importante investigar sua ação sobre as bactérias presentes no trato gastrointestinal, bem como as repercussões sobre o eixo intestino-cérebro, sobre a efetividade do tratamento e sobre a saúde do hospedeiro. Atualmente, ainda poucos estudos têm investigado o efeito dos antidepressivos sobre o crescimento das bactérias residentes do intestino (ZHANG *et al.*, 2021).

7. CONCLUSÃO

- O modelo proposto foi eficiente em desencadear alterações de peso e pelagem em camundongos *Swiss* machos.
- O modelo proposto não foi eficiente em desencadear alterações comportamentais do tipo depressiva, ansiogênica e locomotora em camundongos *Swiss* machos.
- O modelo proposto não foi eficiente em desencadear alterações de diversidade na microbiota intestinal dos animais.
- O estudo finaliza concluindo que o modelo proposto não foi satisfatório para estudos do eixo microbiota-intestino-cérebro.

REFERÊNCIAS

ABLES AZ, BAUGHMAN OL 3rd. Antidepressants: update on new agents and indications. **Am Fam Physician**. 2003 Feb 1;67(3):547-54. Erratum in: *Am Fam Physician*. 2003 May 1;67(9):1874. Erratum in: *Am Fam Physician*. 2004 Mar 1;69(5):1049. PMID: 12588077.

ABONAHAS, Hebatallah H.; DARWISH, Amira M. G.; EL-KAREEM, Hanaa F. Abd; ABONAHAS, Yousef H.; MANSOUR, Safaa A.; KORRA, Yasmin H.; SAYYED, R. Z.; ABDEL-AZEEM, Ahmed M.; SAIED, Essa M.. Trust Your Gut: the human gut microbiome in health and disease. **Microbiome-Gut-Brain Axis**, p. 53-96, 2022.

AIDY, Sahar El; DINAN, Timothy G.; CRYAN, John F. Immune modulation of the brain-gut-microbe axis. **Frontiers In Microbiology**, v. 5, a. 146, 7 abr. 2014.

AFZAAL, Muhammad; SAEED, Farhan; SHAH, Yasir Abbas; HUSSAIN, Muzzamal; RABAIL, Roshina; SOCOL, Claudia Terezia; HASSOUN, Abdo; PATEIRO, Mirian; LORENZO, José M.; RUSU, Alexandru Vasile. Human gut microbiota in health and disease: unveiling the relationship. **Frontiers In Microbiology**, v. 13, p. 1-14, 26 set. 2022.

ALVAREZ, Felix; LEIVA, Omar; OSORES, Jose Manuel. Genomic DNA extraction from seed leaves of *Gossypium barbadense* L. for radioinduced mutations studies. **Instituto Peruano de Energía Nuclear**, p. 183-186, 2008. Instituto Peruano de Energía Nuclear.

ANTONIUK, Svitlana; BIJATA, Monika; PONIMASKIN, Evgeni; WLODARCZYK, Jakub. Chronic unpredictable mild stress for modeling depression in rodents: meta-analysis of model reliability. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 99, p. 101-116, abr. 2019.

ANUKAM, Kingsley & REID, Gregor. (2007). Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's Observation. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**.

APPLETON J. The Gut-Brain Axis: Influence of Microbiota on Mood and Mental Health. **Integr Med (Encinitas)**. 2018 Aug;17(4):28-32.

ARCHER, John. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205-235, maio 1973.

ARUMUGAM, Manimozhiyan; RAES, Jeroen; PELLETIER, Eric; PASLIER, Denis Le; YAMADA, Takuji; MENDE, Daniel R.; FERNANDES, Gabriel R.; TAP, Julien; BRULS, Thomas. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v. 473, n. 7346, p. 174-180, 20 abr. 2011.

AZIZ, Q. et al. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 25, n. 1, p.4-15, 20 dez. 2012.

AYAZ, Muhammad; SUBHAN, Fazal; AHMED, Jawad; KHAN, Arif-Ullah; ULLAH, Farhat; ULLAH, Ihsan; ALI, Gowhar; SYED, Nawazish-I-Husain; HUSSAIN, Sajid. Sertraline enhances the activity of antimicrobial agents against pathogens of clinical relevance. **Journal Of Biological Research**, v. 22, n. 1, p. 1-8, 16 abr. 2015.

AYBEY, A., USTA, A. & DEMIRKAN, E. Effects of psychotropic drugs as bacterial efflux pump inhibitors on quorum sensing regulated behaviors. **J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.** 04, 128–131 (2014).

BAILEY, Michael T.; LUBACH, Gabriele R.; COE, Christopher L. Prenatal Stress Alters Bacterial Colonization of the Gut in Infant Monkeys. **Journal Of Pediatric Gastroenterology And Nutrition**, v. 38, n. 4, p. 414-421, abr. 2004.

BAILEY, Michael T.; DOWD, Scot E.; GALLEY, Jeffrey D.; HUFNAGLE, Amy R.; ALLEN, Rebecca G.; LYTE, Mark. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation. **Brain, Behavior, And Immunity**, v. 25, n. 3, p. 397-407, mar. 2011.

BARANDOUZI, Zahra Amirkhazadeh; STARKWEATHER, Angela R.; HENDERSON, Wendy A.; GYAMFI, Adwoa; CONG, Xiaomei S. Altered Composition of Gut Microbiota in Depression: a systematic review. **Frontiers In Psychiatry**, v. 11, a. 541. 2020.

BOHNERT, Jürgen A.; SZYMANIAK-VITS, Magdalena; SCHUSTER, Sabine; KERN, Winfried V. Efflux inhibition by selective serotonin reuptake inhibitors in *Escherichia coli*. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 9, p. 2057-2060, 23 jun. 2011.

BOUND, Jonathan P.; KITSOU, Katerina; VOULVOULIS, Nikolaos. Household disposal of pharmaceuticals and perception of risk to the environment. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, v. 21, n. 3, p. 301-307, maio 2006.

BORGES, Aline; ROSA, Mariana Silva; RECCHIA, Gustavo Henrique; QUEIROZ-SILVA, Jurema Rosa de; BRESSAN, Eduardo de Andrade; VEASEY, Elizabeth Ann. CTAB methods for DNA extraction of sweetpotato for microsatellite analysis. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 4, p. 529-534, ago. 2009.

BRANCHER, Thyana Lays; HAWERROTH, Maraisa Crestani; KVITSCHAL, Marcus Vinícius; MANENTI, Danielle Caroline. Eficiência de diferentes protocolos de extração de DNA em macieira. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 17, n. 3, p. 361-367, 11 out. 2018.

BRAVO, J. A. et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 108, n. 38, p.16050-16055, 29 ago. 2011.

BREIT, Sigrid; KUPFERBERG, Aleksandra; ROGLER, Gerhard; HASLER, Gregor. Vagus Nerve as Modulator of the Brain–Gut Axis in Psychiatric and Inflammatory Disorders. **Frontiers In Psychiatry**, v. 9, a. 44, p. 1-15, 13 mar. 2018.

BUFFIE, Charlie G.; PAMER, Eric G. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 11, p. 790-801, 7 out. 2013.

BURNS, Corrine. Antidepressant prescribing increases by 35% in six years. **Pharmaceutical Journal**, v. 309, n. 7963, 2022.

BYNDLOSS, Mariana X.; OLSAN, Erin E.; RIVERA-CHÁVEZ, Fabian; TIFFANY, Connor R.; CEVALLOS, Stephanie A.; LOKKEN, Kristen L.; TORRES, Teresa P.; BYNDLOSS, Austin J.; FABER, Franziska; GAO, Yandong. Microbiota-activated PPAR- γ signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. **Science**, v. 357, n. 6351, p. 570-575, 10 ago. 2017.

BYRNE, Claire s; CHAMBERS, Edward s; ALHABEEB, Habeeb; CHHINA, Navpreet; MORRISON, Douglas J; PRESTON, Tom; TEDFORD, Catriona; FITZPATRICK, Julie; IRANI, Cherag; BUSZA, Albert. Increased colonic propionate reduces anticipatory reward responses in the human striatum to high-energy foods. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, v. 104, n. 1, p. 5-14, 11 maio 2016.

CAN, Adem; DAO, David T.; ARAD, Michal; TERRILLION, Chantelle E.; PIANTADOSI, Sean C.; GOULD, Todd D. The Mouse Forced Swim Test. **Journal Of Visualized Experiments**, Maryland, n. 58, p. 1-5, 11 dez. 2011.

CALLAHAN, Benjamin J; MCMURDIE, Paul J; ROSEN, Michael J; HAN, Andrew W; A JOHNSON, Amy Jo; HOLMES, Susan P. DADA2: high-resolution sample inference from illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581-583, 23 maio 2016.

CHAIT, Ait, Y., Mottawea, W., Tompkins, T.A. et al. Unravelling the antimicrobial action of antidepressants on gut commensal microbes. **Sci Rep** 10, 17878 (2020).

CHAMPAGNE-JORGENSEN, Kevin; MIAN, M. Firoz; KAY, Sebastian; HANANI, Hila; ZIV, Oren; NEUFELD, Karen-Anne McVey; KOREN, Omry; BIENENSTOCK, John. Prenatal low-dose penicillin results in long-term sex-specific changes to murine behaviour, immune regulation, and gut microbiota. **Brain, Behavior, And Immunity**, v. 84, p. 154-163, fev. 2020.

CHENIAUX, Elie. Tratamento da disforia pré-menstrual com antidepressivos: revisão dos ensaios clínicos controlados. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 55, n. 2, p. 142-147, 2006.

CHEVALIER, Grégoire; SIOPI, Eleni; GUENIN-MACÉ, Laure; PASCAL, Maud; LAVAL, Thomas; RIFFLET, Aline; BONECA, Ivo Gomperts; DEMANGEL, Caroline; COLSCH, Benoit; PRUVOST, Alain. Effect of gut microbiota on depressive-like behaviors in mice is mediated by the endocannabinoid system. **Nature Communications**, v. 11, a. 6363, dez. 2020.

CLARKE, Gerard; STILLING, Roman M.; KENNEDY, Paul J.; STANTON, Catherine; CRYAN, John F.; DINAN, Timothy G. Minireview: gut microbiota. **Molecular Endocrinology**, v. 28, n. 8, p. 1221-1238, 1 ago. 2014.

CLARRIDGE, Jill E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 840-862, out. 2004.

COLOTTI, Gianni; RINALDI, Teresa. The central role of gut microbiota in drug metabolism and personalized medicine. **Future Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 13, p. 1197-1200, jul. 2020.

COSTA JUNIOR, Ismael L.; PLETSCH, Adelmo L.; TORRES, Yohandra R. Occurrence of Antidepressant Drugs in the Environment - A Review. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, p. 1408-1431, 2014.

COUTAUX, A F; MOONEY, J J; WIRTH, D F. Neuronal monoamine reuptake inhibitors enhance in vitro susceptibility to chloroquine in resistant Plasmodium falciparum. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 38, n. 6, p. 1419-1421, jun. 1994.

COVASA, Mihai; STEPHENS, Richard W.; TODERAN, Roxana; COBUZ, Claudiu. Intestinal Sensing by Gut Microbiota: targeting gut peptides. **Frontiers In Endocrinology**, v. 10, a. 82, p. 1-19, 19 fev. 2019.

CRAWLEY, Jacqueline N. Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. **Mental Retardation And Developmental Disabilities Research Reviews**, Chapel Hill, v. 10, n. 4, p. 248-258, nov. 2004.

CRYAN, John F.; DINAN, Timothy G. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 10, p.701-712, 12 set. 2012.

CRYAN, John F; O'RIORDAN, Kenneth J; SANDHU, Kiran; PETERSON, Veronica; DINAN, Timothy G. The gut microbiome in neurological disorders. **The Lancet Neurology**, v. 19, n. 2, p. 179-194, fev. 2020.

CUIJPERS, Pim; SIJBRANDIJ, Marit; KOOLE, Sander L.; ANDERSSON, Gerhard; BEEKMAN, Aartjan T.; REYNOLDS, Charles F. Adding psychotherapy to antidepressant medication in depression and anxiety disorders: a meta-analysis. **World Psychiatry**, v. 13, n. 1, p. 56-67, fev. 2014.

DESBONNET, L.; GARRETT, L.; CLARKE, G.; KIELY, B.; CRYAN, J.F.; DINAN, T.G.. Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression. **Neuroscience**, v. 170, n. 4, p. 1179-1188, nov. 2010.

DESBONNET, Lieve; CLARKE, Gerard; TRAPLIN, Alexander; O'SULLIVAN, Orla; CRISPIE, Fiona; MOLONEY, Rachel D.; COTTER, Paul D.; DINAN, Timothy G.; CRYAN, John F. Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: implications for brain and behaviour. **Brain, Behavior, And Immunity**, v. 48, p. 165-173, ago. 2015.

DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. Melancholic microbes: a link between gut microbiota and depression?. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 25, n. 9, p.713-719, 1 ago. 2013.

DINAN, Timothy G.; CRYAN, John F. Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. **The Journal Of Physiology**, v. 595, n. 2, p. 489-503, 4 dez. 2016.

DINAN, Timothy G.; CRYAN, John F. The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. **Gastroenterology Clinics Of North America**, v. 46, n. 1, p. 77-89, mar. 2017.

DONALDSON, Gregory P.; LEE, S. Melanie; MAZMANIAN, Sarkis K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 20-32, 26 out. 2015.

ECKBURG, Paul B.; BIK, Elisabeth M.; BERNSTEIN, Charles N.; PURDOM, Elizabeth; DETHLEFSEN, Les; SARGENT, Michael; GILL, Steven R.; NELSON, Karen E.; RELMAN, David A. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1635-1638, 10 jun. 2005.

FAN, Yong; PEDERSEN, Oluf. Gut microbiota in human metabolic health and disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 55-71, jan. 2021.

FORSYTHE, Paul; SUDO, Nobuyuki; DINAN, Timothy; TAYLOR, Valerie H.; BIENENSTOCK, John. Mood and gut feelings. **Brain, Behavior, And Immunity**, v. 24, n. 1, p. 9-16, jan. 2010.

FRÖHLICH, Esther E.; FARZI, Aitak; MAYERHOFER, Raphaela; REICHMANN, Florian; JAČAN, Angela; WAGNER, Bernhard; ZINSER, Erwin; BORDAG, Natalie; MAGNES, Christoph; FRÖHLICH, Eleonore. Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: analysis of gut microbiota-brain communication. **Brain, Behavior, And Immunity**, v. 56, p. 140-155, ago. 2016.

FROST, G. et al. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. **Nat. Commun.** 5:3611 (2014).

FUENTES, Andrea; PINEDA, Moises; VENKATA, Kalyan. Comprehension of Top 200 Prescribed Drugs in the US as a Resource for Pharmacy Teaching, Training and Practice. **Pharmacy**, v. 6, n. 2, p. 43, 14 maio 2018.

FULLER R. Probiotics in man and animals. **J Appl Bacteriol.** 1989 May;66(5):365-78.

FURNESS, John B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 9, n. 5, p. 286-294, 6 mar. 2012.

GÄBELE, Erwin; DOSTERT, Karin; HOFMANN, Claudia; WIEST, Reiner; SCHÖLMERICH, Jürgen; HELLERBRAND, Claus; OBERMEIER, Florian. DSS induced colitis increases portal LPS levels and enhances hepatic inflammation and fibrogenesis in experimental NASH. **Journal Of Hepatology**, v. 55, n. 6, p. 1391-1399, dez. 2011.

GACIAS, Mar; GASPARI, Sevasti; SANTOS, Patricia-Mae G; TAMBURINI, Sabrina; ANDRADE, Monica; ZHANG, Fan; SHEN, Nan; TOLSTIKOV, Vladimir; A KIEBISH, Michael; DUPREE, Jeffrey L. Microbiota-driven transcriptional changes in prefrontal cortex override genetic differences in social behavior. **Elife**, v. 5, e13442, 20 abr. 2016.

GAFOOR, Rafael; BOOTH, Helen P; GULLIFORD, Martin C. Antidepressant utilisation and incidence of weight gain during 10 years' follow-up: population based cohort study. **Bmj**, p. 1951, 23 maio 2018.

GELSLEICHTER, James; SZABO, Nancy J.. Uptake of human pharmaceuticals in bull sharks (*Carcharhinus leucas*) inhabiting a wastewater-impacted river. **Science Of The Total Environment**, v. 456-457, p. 196-201, jul. 2013.

GENEROSO, Jaqueline S.; GIRIDHARAN, Vijayasree V.; LEE, Juneyoung; MACEDO, Danielle; BARICHELLO, Tatiana. The role of the microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric disorders. **Brazilian Journal Of Psychiatry**, v. 43, n. 3, p. 293-305, jun.

GILBERT, Kim; ARSENEAULT-BRÉARD, Jessica; MONACO, Fabio Flores; BEAUDOIN, Alexanne; BAH, Thierno Madjou; TOMPKINS, Thomas A.; GODBOUT, Roger; ROUSSEAU, Guy. Attenuation of post-myocardial infarction depression in rats by n-3 fatty acids or probiotics starting after the onset of reperfusion. **British Journal Of Nutrition**, v. 109, n. 1, p. 50-56, 14 jan. 2013.

GILL, Steven R.; POP, Mihai; DEBOY, Robert T.; ECKBURG, Paul B.; TURNBAUGH, Peter J.; SAMUEL, Buck S.; GORDON, Jeffrey I.; RELMAN, David A.; FRASER-LIGGETT, Claire M.; NELSON, Karen E. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. **Science**, v. 312, n. 5778, p. 1355-1359, 2 jun. 2006.

GOMES, Viviane Ferrari; MIGUEL, Tatiana Longo Borges; MIASSO, Adriana Inocenti. Common Mental Disorders: socio-demographic and pharmacotherapy profile. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, v. 21, n. 6, p.1203-1211, dez. 2013.

GONÇALVES, Mara Andreia Pereira. **Microbiota – implicações na imunidade e no metabolismo**. 2014. 53 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

GUHA, Pokhraj; DAS, Avishek; DUTTA, Somit; CHAUDHURI, Tapas Kumar. A rapid and efficient DNA extraction protocol from fresh and frozen human blood samples. **Journal Of Clinical Laboratory Analysis**, v. 32, n. 1, p. 1-7, 23 fev. 2018.

GUIDA, F.; TURCO, F.; IANNOTTA, M.; GREGORIO, D. de; PALUMBO, I.; SARNELLI, G.; FURIANO, A.; NAPOLITANO, F.; BOCCELLA, S.; LUONGO, L Antibiotic-induced microbiota perturbation causes gut endocannabinoidome changes, hippocampal neuroglial reorganization and depression in mice. **Brain, Behavior, And Immunity**, v. 67, p. 230-245, jan. 2018.

HANSEN, Richard; GAYNES, Bradley; THIEDA, Patricia; GARTLEHNER, Gerald; DEVEAUGH-GEISS, Angela; KREBS, Erin; LOHR, Kathleen. Meta-analysis of Major Depressive Disorder Relapse and Recurrence With Second-Generation Antidepressants. **Psychiatric Services**, v. 59, n. 10, p. 1121-1130, out. 2008.

HAO, Zikai; WANG, Wei; GUO, Rong; LIU, Hong. Faecalibacterium prausnitzii (ATCC 27766) has preventive and therapeutic effects on chronic unpredictable mild stress-induced depression-like and anxiety-like behavior in rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 104, p. 132-142, jun. 2019.rs

HEIJTZ, Rochellys Diaz; WANG, Shugui; ANUAR, Farhana; QIAN, Yu; BJÖRKHOLM, Britta; SAMUELSSON, Annika; HIBBERD, Martin L.; FORSSBERG, Hans; PETTERSSON, Sven. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 108, n. 7, p. 3047-3052, 31 jan. 2011.

HERSELMAN, Mauritz F.; BAILEY, Sheree; BOBROVSKAYA, Larisa. The Effects of Stress and Diet on the “Brain–Gut” and “Gut–Brain” Pathways in Animal Models of Stress and Depression. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 23, a. 2013, 11 fev. 2022.

HOBAN, A., STILLING, R., RYAN, F. et al. Regulation of prefrontal cortex myelination by the microbiota. **Transl Psychiatry** 6, e774 (2016).

HOYLES, Lesley; SNELLING, Tom; UMLAI, Umm-Kulthum; NICHOLSON, Jeremy K.; CARDING, Simon R.; GLEN, Robert C.; MCARTHUR, Simon. Microbiome–host systems interactions: protective effects of propionate upon the blood-brain barrier. **Microbiome**, v. 6, n. 55, 21 mar. 2018.

HU, Yongfei; YANG, XI; QIN, Junjie; LU, Na; CHENG, Gong; WU, Na; PAN, Yuanlong; LI, Jing; ZHU, Liying; WANG, Xin. Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. **Nature Communications**, v. 4, n. 1, 2151, 23 jul. 2013.

HUANG, Ting-Ting; LAI, Jian-Bo; DU, Yan-Li; XU, Yi; RUAN, Lie-Min; HU, Shao-Hua. Current Understanding of Gut Microbiota in Mood Disorders: an update of human studies. **Frontiers In Genetics**, v. 10, p. 1-12, 19 fev. 2019.

HUANG, Li; LV, Xia; ZE, Xiaolei; MA, Zewei; ZHANG, Xuguang; HE, Ruikun; FAN, Junting; ZHANG, Meilin; SUN, Boran; WANG, Fang. Combined probiotics attenuate chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like and anxiety-like behaviors in rats. **Frontiers In Psychiatry**, v. 13: 990465, p. 1-15, 7 set. 2022.

HUMPHREYS, Corene. Intestinal Permeability. **Textbook Of Natural Medicine**, p. 166-177, 2020. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-43044-9.00019-4>.

INGLIS, Peter W.; PAPPAS, Marilia de Castro R.; RESENDE, Lucileide V.; GRATTAPAGLIA, Dario. Fast and inexpensive protocols for consistent extraction of high quality DNA and RNA from challenging plant and fungal samples for high-throughput SNP genotyping and sequencing applications. **Plos One**, v. 13, n. 10, p. 1-14, 18 out. 2018.

JANAK, Patricia H.; TYE, Kay M. From circuits to behaviour in the amygdala. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 284-292, 14 jan. 2015.

JANDHYALA, Sai Manasa. Role of the normal gut microbiota. **World Journal Of Gastroenterology**, v. 21, n. 29, p. 8787, 2015.

JENA, Lingaraja; WAGHMARE, Pranita; KASHIKAR, Supriya; KUMAR, Satish; HARINATH, Bhaskar C. Computational approach to understanding the mechanism of action of isoniazid, an anti-TB drug. **International Journal Of Mycobacteriology**, v. 3, n. 4, p. 276-282, dez. 2014.

JERNBERG, Cecilia; LÖFMARK, Sonja; EDLUND, Charlotta; JANSSON, Janet K.. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. **Microbiology**, v. 156, n. 11, p. 3216-3223, 1 nov. 2010.

JOUROVÁ, Lenka; ANZENBACHER, Pavel; ANZENBACHEROVA, Eva. Human gut microbiota plays a role in the metabolism of drugs. **Biomedical Papers**, v. 160, n. 3, p. 317-326, 20 set. 2016.

JOUROVÁ, Lenka; VAVRECKOVA, Marketa; ZEMANOVA, Nina; ANZENBACHER, Pavel; LANGOVA, Katerina; HERMANOVA, Petra; HUDCOVIC, Tomas; ANZENBACHEROVA, Eva. Gut Microbiome Alters the Activity of Liver Cytochromes P450 in Mice With Sex-Dependent Differences. **Frontiers In Pharmacology**, v. 11, p. 1-6, 2 out. 2020.

JUNG, Yang-Hee; HONG, Sa-Ik; MA, Shi-Xun; HWANG, Ji-Young; KIM, Jun-Sup; LEE, Ju-Hyun; SEO, Jee-Yeon; LEE, Seok-Yong; JANG, Choon-Gon. Strain Differences in the Chronic Mild Stress Animal Model of Depression and Anxiety in Mice. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 22, n. 5, p. 453-459, 30 set. 2014.

KAATZ, G. Phenylpiperidine selective serotonin reuptake inhibitors interfere with multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 3, p.254-261, set. 2003.

KAIDANOVICH-BEILIN, Oksana; LIPINA, Tatiana; VUKOBRADOVIC, Igor; RODER, John; WOODGETT, James R. Assessment of Social Interaction Behaviors. **Journal Of Visualized Experiments**, Toronto, n. 48, p. 1-6, 25 fev. 2011. MyJove Corporation.

KALAYCI, Sadik. Antimicrobial Properties of Various Non-Antibiotic Drugs against Microorganisms. **Journal Of Bioanalysis & Biomedicine**, v. 8, n. 4, 1000e142, 2016.

KALAYCI, Sadik; DEMIRCI, Selami; SAHIN, Fikrettin. Antimicrobial Properties of Various Psychotropic Drugs Against Broad Range Microorganisms. **Current Psychopharmacology**, v. 3, n. 3, p. 195-202, 29 jun. 2015.

KEENEY, Kristie M.; YURIST-DOUTSCH, Sophie; ARRIETA, Marie-Claire; FINLAY, B. Brett. Effects of Antibiotics on Human Microbiota and Subsequent Disease. **Annual Review Of Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 217-235, 8 set. 2014.

KELLER, Matthew C.; NEALE, Michael C.; KENDLER, Kenneth S. Association of Different Adverse Life Events With Distinct Patterns of Depressive Symptoms. **American Journal Of Psychiatry**, v. 164, n. 10, p. 1521-1529, out. 2007.

KHAN, M. Firoze; WANG, Hui. Environmental Exposures and Autoimmune Diseases: contribution of gut microbiome. **Frontiers In Immunology**, v. 10, p. 1-11, 10 jan. 2020.

KHO ZY and Lal SK (2018) The Human Gut Microbiome – A Potential Controller of Wellness and Disease. **Front. Microbiol.** 9:1835.

K.L. Tiwari, S.K. Jadhav and S. Gupta, 2012. Modified CTAB Technique for Isolation of DNA from some Medicinal Plants. **Research Journal of Medicinal Plants**, 6: 65-73.

KHO, Zhi Y.; LAL, Sunil K.. The Human Gut Microbiome – A Potential Controller of Wellness and Disease. **Frontiers In Microbiology**, v. 9, p. 1-23, 14 ago. 2018.

KOPPEL, Nitzan; REKDAL, Vayu Maini; BALSUS, Emily P. Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota. **Science**, Cambridge, v. 356, n. 6344, p. eaag2770-11, 23 jun. 2017.

KONIECZNA P, Groeger D, Ziegler M et al. Bifidobacterium infantis 35624 administration induces Foxp3 T regulatory cells in human peripheral blood: potential role for myeloid and plasmacytoid dendritic cells. **Gut** 2012; 61: 354–66.

KOVTUN, Alexey S.; AVERINA, Olga V.; ALEKSEEVA, Maria G.; DANILENKO, Valery N. Antibiotic Resistance Genes in the Gut Microbiota of Children with Autistic Spectrum Disorder as Possible Predictors of the Disease. **Microbial Drug Resistance**, [S.L.], v. 26, n. 11, p. 1307-1320, 1 nov. 2020.

KUMAR, Jitendra; KUMAR, Manoj; GUPTA, Shashank; AHMED, Vasim; BHAMBI, Manu; PANDEY, Rajesh; CHAUHAN, Nar Singh. An Improved Methodology to Overcome Key Issues in Human Fecal Metagenomic DNA Extraction. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 14, n. 6, p. 371-378, dez. 2016.

LACH, G., Morais, L. H., Costa, A. P. R., & Hoeller, A. A. (2017). ENVOLVIMENTO DA FLORA INTESTINAL NA MODULAÇÃO DE DOENÇAS PSIQUIÁTRICAS. VITTALLE - **Revista De Ciências Da Saúde**, 29(1), 64–82.

LANKELMA, J M et al. The gut microbiota in internal medicine: implications for health and disease. **Neth J Med**, Amsterdam, v. 73, n. 2, p. 61-68, fev. 2015.

LASS-FLÖRL, Cornelia; DIERICH, Manfred P.; FUCHS, Dietmar; SEMENITZ, Elisabeth; LEDOCHOWSKI, Maximilian. Antifungal Activity Against Candida Species of the Selective Serotonin-Reuptake Inhibitor, Sertraline. **Clinical Infectious Diseases**, Innsbruck, v. 33, n. 12, p. 135-136, 15 dez. 2001.

LEDOUX, Joseph. The amygdala. **Current Biology**, v. 17, n. 20, p. R868-R874, out. 2007.

LEVY, Maayan; KOLODZIEJCZYK, Aleksandra A.; THAISS, Christoph A.; ELINAV, Eran. Dysbiosis and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 4, p. 219-232, 6 mar. 2017.

LI, Junhua; JIA, Huijue; CAI, Xianghang; ZHONG, Huanzi; FENG, Qiang; SUNAGAWA, Shinichi; ARUMUGAM, Manimozhiyan; KULTIMA, Jens Roat; PRIFTI, Edi. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 8, p. 834-841, 6 jul. 2014.

LIN, Hua V.; FRASSETTO, Andrea; KOWALIK JUNIOR, Edward J.; NAWROCKI, Andrea R.; LU, Mofei M.; KOSINSKI, Jennifer R.; HUBERT, James A.; SZETO, Daphne; YAO, Xiaorui; FORREST, Gail. Butyrate and Propionate Protect against Diet-Induced Obesity and Regulate Gut Hormones via Free Fatty Acid Receptor 3-Independent Mechanisms. **Plos One**, v. 7, n. 4, e35240, 10 abr. 2012.

LIU, Yue; WANG, Jiaqi; WU, Changxin. Modulation of Gut Microbiota and Immune System by Probiotics, Pre-biotics, and Post-biotics. **Frontiers In Nutrition**, v. 8, p. 1-14, 3 jan. 2022.

LODHI, Muhammad A.; YE, Guang-Ning; WEEDEN, Norman F.; REISCH, Bruce I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and Vitis species. **Plant Molecular Biology Reporter**, Geneva, v. 12, n. 1, p. 6-13, mar. 1994.

LUCZYNSKI, Pauline; NEUFELD, Karen-Anne McVey; ORIACH, Clara Seira; CLARKE, Gerard; DINAN, Timothy G.; CRYAN, John F. Growing up in a Bubble: using germ-free animals to assess the influence of the gut microbiota on brain and behavior. **International Journal Of Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 8, pyw020, 23 fev. 2016.

LUKIC, Iva; GETSELTER, Dmitriy; ZIV, Oren; ORON, Oded; REUVENI, Eli; KOREN, Omry; ELLIOTT, Evan. Antidepressants affect gut microbiota and Ruminococcus flavefaciens is able to abolish their effects on depressive-like behavior. **Translational Psychiatry**, v. 9, 9 abr. 2019.

LUO, Yan; KATAOKA, Yuki; OSTINELLI, Edoardo G.; CIPRIANI, Andrea; FURUKAWA, Toshi A.. National Prescription Patterns of Antidepressants in the Treatment of Adults With Major Depression in the US Between 1996 and 2015: a population representative survey based analysis. **Frontiers In Psychiatry**, v. 11, n. 35, p. 1-11, 14 fev. 2020.

MACEDO, Danielle; CHAVES FILHO, Adriano José Maia; SOUSA, Caren Nádia Soares de; QUEVEDO, João; BARICHELLO, Tatiana; NOBRE JÚNIOR, Hélio Vitoriano; LUCENA, David Freitas de. Antidepressants, antimicrobials or both? Gut microbiota dysbiosis in depression and possible implications of the antimicrobial effects of antidepressant drugs for antidepressant effectiveness. **Journal Of Affective Disorders**, v. 208, p. 22-32, jan. 2017.

MALARD, Florent; DORE, Joel; GAUGLER, Béatrice; MOHTY, Mohamad. Introduction to host microbiome symbiosis in health and disease. **Mucosal Immunology**, v. 14, n. 3, p. 547-554. 2021.

MARASINE, Nirmal Raj; SANKHI, Sabina; LAMICHHANE, Rajendra; MARASINI, Nabin Raj; DANGI, Nim Bahadur. Use of Antidepressants among Patients Diagnosed with Depression: a scoping review. **Biomed Research International**, v. 2021, p. 1-8, 15 mar. 2021.

MAYER, Emeran A.. Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, n. 8, p. 453-466, 13 jul. 2011.

MCGOVERN, Abigail s; HAMLIN, Adam s; WINTER, Gal. A review of the antimicrobial side of antidepressants and its putative implications on the gut microbiome. **Australian & New Zealand Journal Of Psychiatry**, v. 53, n. 12, p. 1151-1166, 26 set. 2019.

MCCANN, Angela; JEFFERY, Ian B; OULIASS, Bouchra; FERLAND, Guylaine; FU, Xueyen; BOOTH, Sarah L; TRAN, Tam T T; O'TOOLE, Paul W; O'CONNOR, Eibhlís M. Exploratory analysis of covariation of microbiota-derived vitamin K and cognition in older adults. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, v. 110, n. 6, p. 1404-1415, 13 set. 2019.

MUNOZ-BELLIDO, J.L.; MUNOZ-CRIADO, S; GARCÍA-RODRÍGUEZ, J.A. Antimicrobial activity of psychotropic drugs. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, v. 14, n. 3, p. 177-180, abr. 2000.

MACKIE, Roderick I; SGHIR, Abdelghani; GASKINS, H Rex. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, v. 69, n. 5, p. 1035s-1045s, 1 maio 1999.

MARTÍNEZ, Elda M.; JIMÉNEZ-RODRÍGUEZ, Mildred G.; MARTÍNEZ-RUIZ, Manuel; PEÑA-BENAVIDES, Samantha Ayde; IQBAL, Hafiz M.N.; PARRA-SALDÍVAR, Roberto; HERNÁNDEZ, Juan Eduardo Sosa-. Antidepressants surveillance in wastewater: overview extraction and detection. **Case Studies In Chemical And Environmental Engineering**, v. 3, p. 100074, jun. 2021.

MCGOVERN, Abigail s; HAMLIN, Adam s; WINTER, Gal. A review of the antimicrobial side of antidepressants and its putative implications on the gut microbiome. **Australian & New Zealand Journal Of Psychiatry**, v. 53, n. 12, p. 1151-1166, 26 set. 2019.

MOJTABAI, Ramin; OLFSON, Mark. Proportion Of Antidepressants Prescribed Without A Psychiatric Diagnosis Is Growing. **Health Affairs**, v. 30, n. 8, p. 1434-1442, ago. 2011.

MOJTABAI, Ramin; OLFSON, Mark. National Trends in Long-Term Use of Antidepressant Medications. **The Journal Of Clinical Psychiatry**, [S.L.], v. 75, n. 02, p. 169-177, 10 dez. 2013.

MOLNÁR, J. Antiplasmodial activity of tricyclic compounds. **Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.** 10, 467-474, 1988.

MONTEIRO, Susana; ROQUE, Susana; SÁNCHEZ-CALZADA, Daniela de; SOUSA, Nuno; CORREIA-NEVES, Margarida; CERQUEIRA, João José. An Efficient Chronic Unpredictable Stress Protocol to Induce Stress-Related Responses in C57BL/6 Mice. **Frontiers In Psychiatry**, v. 6, 2 fev. 2015.

MOREIRA, Diana Gomes; AIRES, Ana; PEREIRA, Maria de Lourdes; OLIVEIRA, Miguel. Levels and effects of antidepressant drugs to aquatic organisms. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 256, p. 109322, jun. 2022.

MORENO, R A; MORENO, D H; SOARES, M B M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Braz. J. Psychiatry** 21 (suppl 1), Maio 1999.

MOSCONI, Matthew W.; CODY-HAZLETT, Heather; POE, Michele D.; GERIG, Guido; GIMPEL-SMITH, Rachel; PIVEN, Joseph. Longitudinal Study of Amygdala Volume and Joint Attention in 2- to 4-Year-Old Children With Autism. **Archives Of General Psychiatry**, v. 66, n. 5, p. 509, 1 maio 2009.

MOY SS, NADLER JJ, PEREZ A, BARBARO RP, JONHS JM, MAGNUSON TR, PIVEN J, CRAWLEY JN. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. **Genes, brain, and behavior**. 2004;3:287–302.

NAIR, Anroopb; JACOB, Shery. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **Journal Of Basic And Clinical Pharmacy**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.27-31, 2016.

NAKOV, Radislav; VELIKOVA, Tsvetelina. Chemical Metabolism of Xenobiotics by Gut Microbiota. **Current Drug Metabolism**, v. 21, n. 4, p. 260-269, 25 jun. 2020.

NAYAK N. & Satpathy, G. Slime production as a virulence factor in *Staphylococcus epidermidis* isolated from bacterial keratitis. **Indian J. Med. Res.** 111, 6–10 (2000).

NEUFELD, K. A. McVey; MAO, Y. K.; BIENENSTOCK, J.; FOSTER, J. A.; KUNZE, W. A. The microbiome is essential for normal gut intrinsic primary afferent neuron excitability in the mouse. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 25, n. 2, p. 183-188, 27 nov. 2012.

NOLLET, Mathieu. Models of Depression: unpredictable chronic mild stress in mice. **Current Protocols**, v. 1, n. 8, ago. 2021.

NOORDAM, Raymond; AARTS, Nikkie; VERHAMME, Katia M.; STURKENBOOM, Miriam C. M.; STRICKER, Bruno H.; VISSER, Loes E. Prescription and indication trends of antidepressant drugs in the Netherlands between 1996 and 2012: a dynamic population-based study. **European Journal Of Clinical Pharmacology**, v. 71, n. 3, p. 369-375, 6 jan.

NOVAKOVIC, Marko; ROUT, Amit; KINGSLEY, Thomas; KIRCHOFF, Robert; SINGH, Amteshwar; VERMA, Vipin; KANT, Ravi; CHAUDHARY, Rahul. Role of gut microbiota in cardiovascular diseases. **World Journal Of Cardiology**, v. 12, n. 4, p. 110-122, 26 abr. 2020.

NEVES, Vanessa da Costa. **Avaliação de protocolos de extração de DNA empregados na detecção de Trypanosoma cruzi Chagas, 1909 por PCR em triatomíneos**. 2010. 181 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

NICHOLSON, Jeremy K.; HOLMES, Elaine; KINROSS, James; BURCELIN, Remy; GIBSON, Glenn; JIA, Wei; PETTERSSON, Sven. Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1262-1267, 8 jun. 2012.

NOH, Keumhan; KANG, You Ra; NEPAL, Mahesh Raj; SHAKYA, Rajina; KANG, Mi Jeong; KANG, Wonku; LEE, Sangkyu; JEONG, Hye Gwang; JEONG, Tae Cheon. Impact of gut microbiota on drug metabolism: an update for safe and effective use of drugs. **Archives Of Pharmacal Research**, v. 40, n. 12, p. 1345-1355, 27 nov. 2017.

NOGUEIRA, Bárbara Lisboa. **Probióticos para o tratamento de doenças neurológicas: uma revisão**. 2015. 35 f. Monografia (Especialização) - Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

O'LEARY, Olivia F.; OGBONNAYA, Ebere S.; FELICE, Daniela; LEVONE, Brunno R.; CONROY, Lorraine C.; FITZGERALD, Patrick; BRAVO, Javier A.; FORSYTHE, Paul; BIENENSTOCK, John; DINAN, Timothy G. The vagus nerve modulates BDNF expression and neurogenesis in the hippocampus. **European Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 2, p. 307-316, fev. 2018.

OLFSON, Mark; HE, Jian-Ping; MERIKANGAS, Kathleen Ries. Psychotropic Medication Treatment of Adolescents: results from the national comorbidity survey: adolescent supplement. **Journal Of The American Academy Of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 52, n. 4, p. 378-388, abr. 2013.

OLIVEIRA AS, Martinez-de-Oliveira J, Palmeira-de-Oliveira R, Palmeira-de-Oliveira A, et al. (2017) Antifungal Activity of Antidepressant Sertraline against Candida Species In vitro: A Potential Beneficial Association with Fluconazole. **Med J Obstet Gynecol** 5(1): 1095.

O'MAHONY, S.M.; CLARKE, G.; BORRE, Y.e.; DINAN, T.G.; CRYAN, J.F.. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. **Behavioural Brain Research**, v. 277, p. 32-48, jan. 2015.

OMS. World mental health report: transforming mental health for all. Geneva: **World Health Organization; 2022**. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

ORTEGA-MARTÍNEZ, Sylvia. A new perspective on the role of the CREB family of transcription factors in memory consolidation via adult hippocampal neurogenesis. **Frontiers In Molecular Neuroscience**, v. 8, p 46, 26 ago. 2015.

PARK, Jeongho; WANG, Qin; WU, Qi; MAO-DRAAYER, Yang; KIM, Chang H.. Bidirectional regulatory potentials of short-chain fatty acids and their G-protein-coupled receptors in autoimmune neuroinflammation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 20 jun. 2019.

PENDERS, John; STOBBERINGH, Ellen E.; SAVELKOUL, Paul H. M.; WOLFFS, Petra F. G. The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. **Frontiers In Microbiology**, v. 4:81, 2013.

PERSON, Hannibal; KEEFER, Laurie. Psychological comorbidity in gastrointestinal diseases: update on the brain-gut-microbiome axis. **Progress In Neuro-Psychopharmacology And Biological Psychiatry**, v. 107, p. 110209, abr. 2021.

PIRES, Douglas Eduardo Valente; OLIVEIRA, Francislon Silva; CORREA, Felipe Borim; MORAIS, Daniel Kumazawa; FERNANDES, Gabriel Rocha. TAG.ME: taxonomic assignment of genetic markers for ecology. **Biorxiv** 263293, 2018.

PLIEGER, T.; MELCHERS, M.; MONTAG, C.; MEERMANN, R.; REUTER, M.. Life stress as potential risk factor for depression and burnout. **Burnout Research**, v. 2, n. 1, p. 19-24, mar. 2015.

PORSOLT, R. D.; PICHON, M. Le; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-732, abr. 1977.

PUTNAM EE, GOODMAN AL (2020) B vitamin acquisition by gut commensal bacteria. **PLoS Pathog** 16(1): e1008208.

QIN, Junjie; LI, Ruiqiang; RAES, Jeroen; ARUMUGAM, Manimozhayan; BURGDORF, Kristoffer Solvsten; MANICHANH, Chaysavanh; NIELSEN, Trine; PONS, Nicolas; LEVENEZ, Florence. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 59-65, mar. 2010.

RAMSTEIJN, Anouschka s; JAŁAREVIĆ, Eldin; HOUWING, Danielle J; BALE, Tracy L; OLIVIER, Jocelien da. Antidepressant treatment with fluoxetine during pregnancy and lactation modulates the gut microbiome and metabolome in a rat model relevant to depression. **Gut Microbes**, v. 11, n. 4, p. 735-753, 23 jan. 2020.

RASTELLI, Marialetizia; CANI, Patrice D; KNAUF, Claude. The Gut Microbiome Influences Host Endocrine Functions. **Endocrine Reviews**, v. 40, n. 5, p. 1271-1284, 13 maio 2019.

ROGERS, G B et al. From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: mechanisms and pathways. **Molecular Psychiatry**, v. 21, n. 6, p.738-748, 19 abr. 2016.

REGINATO, Caroline Z.; BRÄUNIG, Patrícia; PORTELLA, Luiza P.; MORTARI, Ana Paula G.; MINUZZI, Camila E.; SANGIONI, Luis Antonio; VOGEL, Fernanda S.F. DNA

extraction methods for molecular detection of *Eimeria* spp. in cattle and sheep. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Santa Maria, v. 40, n. 7, p. 514-518, jul. 2020.

REIGSTAD, Christopher S.; SALMONSON, Charles E.; III, John F. Rainey; SZURSZEWSKI, Joseph H.; LINDEN, David R.; SONNENBURG, Justin L.; FARRUGIA, Gianrico; KASHYAP, Purna C.. Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 4, p. 1395-1403, 2015.

ROBINSON, Courtney J.; YOUNG, Vincent B. Antibiotic administration alters the community structure of the gastrointestinal microbiota. **Gut Microbes**, v. 1, n. 4, p. 279-284, jul. 2010.

RUTSCH, Andrina; KANTSJÖ, Johan B.; RONCHI, Francesca. The Gut-Brain Axis: how microbiota and host inflammasome influence brain physiology and pathology. **Frontiers In Immunology**, v. 11, a. 604179, 10 dez. 2020.

SAHAY, Amar; HEN, Rene. Adult hippocampal neurogenesis in depression. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 9, p. 1110-1115, 28 ago. 2007.

SALMINEN, S. Demonstration of safety of probiotics — a review. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 44, n. 1-2, p. 93-106, 20 out. 1998.

SALMINEN, Seppo; COLLADO, Maria Carmen; ENDO, Akihito; HILL, Colin; LEBEER, Sarah; QUIGLEY, Eamonn M. M.; SANDERS, Mary Ellen; SHAMIR, Raanan; SWANN, Jonathan R.; SZAJEWSKA, Hania. Publisher Correction: the international scientific association of probiotics and prebiotics (isapp) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 18, n. 9, p. 671-671, 15 jun. 2021.

SCHREZENMEIR, Jürgen; VRESE, Michael de. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 361-364, 1 fev. 2001.

SCHUMANN, Cynthia; BAUMAN, M.D; MACHADO, Christopher; AMARAL, David;. The Social Brain, Amygdala, and Autism. **Understanding Autism**, p. 227-253, 25 abr. 2006.

SILVESTRE, Carina Maria Rôlo Ferreira. **O diálogo entre o cérebro e o intestino – Qual o papel dos probióticos?** 2015. 54 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado Integrado em Medicina, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2015.

SHEFFLER ZM, Abdijadid S. Antidepressants. [Updated 2021 Nov 14]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan.

SHEN, Yang; YANG, Xiao; LI, Gaofei; GAO, Jiayu; LIANG, Ying. The change of gut microbiota in MDD patients under SSRIs treatment. **Scientific Reports**, v. 11, a. 14918, 21 jul. 2021.

SHOJI, Hirotaka; MIYAKAWA, Tsuyoshi. Increased depression-related behavior during the postpartum period in inbred BALB/c and C57BL/6 strains. **Molecular Brain**, v. 12, n. 1, 9 ago. 2019.

SKURTVEIT, S.; BRAMNESS, J. G.; HJELLVIK, V.; HARTZ, I.; NESVÅG, R.; HAUGE, L. J.; HANDAL, M. Increase in diagnosis of depressive disorders contributes to the increase in antidepressant use in adolescents. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 137, n. 5, p. 413-421, 5 abr. 2018.

SPENCE, Des. Bad Medicine: the rise and rise of antidepressants. **British Journal Of General Practice**, v. 66, n. 652, p. 573-573, 27 out. 2016.

STAHL SM, GRADY MM. Differences in mechanism of action between current and future antidepressants. **J Clin Psychiatry**. 2003;64 Suppl 13:13-7.

STAPPENBECK, Thaddeus S.; HOOPER, Lora V.; GORDON, Jeffrey I. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 99, n. 24, p. 15451-15455, 13 nov. 2002.

STILLING, Roman M.; RYAN, Feargal J.; HOBAN, Alan E.; SHANAHAN, Fergus; CLARKE, Gerard; CLAEISSON, Marcus J.; DINAN, Timothy G.; CRYAN, John F. Microbes & neurodevelopment – Absence of microbiota during early life increases activity-related transcriptional pathways in the amygdala. **Brain, Behavior, And Immunity**, v. 50, p. 209-220, nov. 2015.

STILLING, Roman M.; WOUW, Marcel van de; CLARKE, Gerard; STANTON, Catherine; DINAN, Timothy G.; CRYAN, John F. The neuropharmacology of butyrate: the bread and butter of the microbiota-gut-brain axis? **Neurochemistry International**, v. 99, p. 110-132, out. 2016.

STOJANOVIC, Mirjana; HEILIG, Hans G. H. J.; TIMS, Sebastian; ZOETENDAL, Erwin G.; VOS, Willem M. de. Long-term monitoring of the human intestinal microbiota composition. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 1146-1159, abr. 2013.

TANG, Wei; ZHU, Huifeng; FENG, Yanmei; GUO, Rui; WAN, Dong. The Impact of Gut Microbiota Disorders on the Blood–Brain Barrier. **Infection And Drug Resistance**, v. 13, p. 3351-3363, set. 2020.

TARGUM SD. Identification and treatment of antidepressant tachyphylaxis. **Innov Clin Neurosci**. 2014 Mar;11(3-4):24-8.

THOMAS, Michael A.; KLAPER, Rebecca D.. Psychoactive Pharmaceuticals Induce Fish Gene Expression Profiles Associated with Human Idiopathic Autism. **Plos One**, v. 7, n. 6, e32917, 6 jun. 2012.

THOMPSON, William Andrew; VIJAYAN, Mathilakath M.. Antidepressants as Endocrine Disrupting Compounds in Fish. **Frontiers In Endocrinology**, v. 13, a. 895064, 16 jun. 2022.

TURNBAUGH, Peter J.; HAMADY, Micah; YATSUNENKO, Tanya; CANTAREL, Brandi L.; DUNCAN, Alexis; LEY, Ruth E.; SOGIN, Mitchell L.; JONES, William J.; ROE, Bruce A.; AFFOURTIT, Jason P. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 480-484, 30 nov. 2008.

SILVERSTEIN-METZLER, Marnie G.; SHIVELY, Carol A.; CLARKSON, Thomas B.; APPT, Susan E.; CARR, J.Jeffrey; KRITCHEVSKY, Stephen B.; JONES, Sara R.; REGISTER, Thomas C.. Sertraline inhibits increases in body fat and carbohydrate dysregulation in adult female cynomolgus monkeys. **Psychoneuroendocrinology**, v. 68, p. 29-38, jun. 2016.

SUN, Shan; ZHU, Xiangzhu; HUANG, Xiang; MURFF, Harvey J.; NESS, Reid M.; SEIDNER, Douglas L.; SORGEN, Alicia A.; BLAKLEY, Ivory C.; YU, Chang; DAI, Qi. On the robustness of inference of association with the gut microbiota in stool, rectal swab and mucosal tissue samples. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 21 jul. 2021.

VADDER, Filipe; KOVATCHEVA-DATCHARY, Petia; GONCALVES, Daisy; VINERA, Jennifer; ZITOUN, Carine; DUCHAMPT, Adeline; BÄCKHED, Fredrik; MITHIEUX, Gilles. Microbiota-Generated Metabolites Promote Metabolic Benefits via Gut-Brain Neural Circuits. **Cell**, v. 156, n. 1-2, p. 84-96, jan. 2014.

VADDER, Filipe de; GRASSET, Estelle; HOLM, Louise Mannerås; KARSENTY, Gérard; MACPHERSON, Andrew J.; OLOFSSON, Louise E.; BÄCKHED, Fredrik. Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 115, n. 25, p. 6458-6463, 4 jun. 2018.

VALDES A M, WALTER J, SEGAL E, SPECTOR T D. Role of the gut microbiota in nutrition and health. **BMJ** 2018; 361 :k2179.

VAN SCHAIK, Willem. The human gut resistome. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*, v. 370, n. 1670, p. 20140087, 5 jun. 2015.

VECSEY, C. G.; HAWK, J. D.; LATTAL, K. M.; STEIN, J. M.; FABIAN, S. A.; ATTNER, M. A.; CABRERA, S. M.; MCDONOUGH, C. B.; BRINDLE, P. K.; ABEL, T.. Histone Deacetylase Inhibitors Enhance Memory and Synaptic Plasticity via CREB: cbp-dependent transcriptional activation. **Journal Of Neuroscience**, v. 27, n. 23, p. 6128-6140, 6 jun. 2007.

VIEIRA, Rodrigo; BAUMANN, Jacqueline; WHEELER-CASTILLO, Cristina; LATOV, David; HENTER, Ioline; SALVADORE, Giacomo; ZARATE, Carlos. The Timing of Antidepressant Effects: a comparison of diverse pharmacological and somatic treatments. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 1, p. 19-41, 6 jan. 2010.

VRIEZE, Anne; OUT, Carolien; FUENTES, Susana; JONKER, Lisanne; REULING, Isaie; KOOTTE, Ruud S.; VAN NOOD, Els; HOLLEMAN, Frits; KNAAPEN, Max; ROMIJN, Johannes A. Impact of oral vancomycin on gut microbiota, bile acid metabolism, and insulin sensitivity. **Journal Of Hepatology**, v. 60, n. 4, p. 824-831, abr. 2014.

WALKER, Alan W.; LAWLEY, Trevor D. Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. **Pharmacological Research**, v. 69, n. 1, p. 75-86, mar. 2013.

WILLNER, Paul. Reliability of the chronic mild stress model of depression: a user survey. **Neurobiology Of Stress**, v. 6, p. 68-77, fev. 2017.

WEST, Christina E. Gut microbiota and allergic disease. **Current Opinion In Clinical Nutrition And Metabolic Care**, v. 17, n. 3, p. 261-266, maio 2014.

WONG, Julia M. W.; SOUZA, Russell de; KENDALL, Cyril W. C.; EMAM, Azadeh; JENKINS, David J. A. Colonic Health: fermentation and short chain fatty acids. **Journal Of Clinical Gastroenterology**, v. 40, n. 3, p. 235-243, mar. 2006.

WU, Hsin-Jung; WU, Eric. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. **Gut Microbes**, v. 3, n. 1, p. 4-14, jan. 2012.

XIN, Zhanguo; CHEN, Junping. A high throughput DNA extraction method with high yield and quality. **Plant Methods**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2012.

YAN, Hannah; WALKER, Forrest C.; ALI, Arushana; HAN, Hyojeong; TAN, Lin; VEILLON, Lucas; LORENZI, Philip L.; BALDRIDGE, Megan T.; KING, Katherine Y.. The bacterial microbiota regulates normal hematopoiesis via metabolite-induced type 1 interferon signaling. **Blood Advances**, v. 6, n. 6, p. 1754-1765, 15 mar. 2022.

YANG, Fangming; SUN, Jihua; LUO, Huainian; REN, Huahui; ZHOU, Hongcheng; LIN, Yuxiang; HAN, Mo; CHEN, Bing; LIAO, Hailong; BRIX, Susanne. Assessment of fecal DNA extraction protocols for metagenomic studies. **Gigascience**, v. 9, n. 7, p. 1-12, 1 jul. 2020.

YATSUNENKO, Tanya; REY, Federico E.; MANARY, Mark J.; TREHAN, Indi; DOMINGUEZ-BELLO, Maria Gloria; CONTRERAS, Monica; MAGRIS, Magda; HIDALGO, Glida; BALDASSANO, Robert N.; ANOKHIN, Andrey P. Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 222-227, 9 maio 2012.

YE, Jian; JI, Anquan; PARRA, Esteban J.; ZHENG, Xiufen; JIANG, Chengtao; ZHAO, Xingchun; HU, Lan; TU, Zheng. A Simple and Efficient Method for Extracting DNA From Old and Burned Bone. **Journal Of Forensic Sciences**, West Conshohocken, v. 49, n. 4, p. 1-6, 2004.

YOUNG, T. J. Antifungal activity of selective serotonin reuptake inhibitors attributed to non-specific cytotoxicity. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, Kent, v. 51, n. 4, p. 1045-1047, 13 mar. 2003.

YU Z, Zhang J, Zheng Y and Yu L (2020) Trends in Antidepressant Use and Expenditure in Six Major Cities in China From 2013 to 2018. **Front. Psychiatry** 11:551.

ZHANG, Bao-Wei; LI, Ming; MA, Li-Chao; WEI, Fu-Wen. A Widely Applicable Protocol for DNA Isolation from Fecal Samples. **Biochemical Genetics**, v. 44, n. 11-12, p. 503-512, 9 nov. 2006.

ZHANG, Weijie; QU, Wan; WANG, Hua; YAN, He. Antidepressants fluoxetine and amitriptyline induce alterations in intestinal microbiota and gut microbiome function in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. **Translational Psychiatry**, v. 11: 131. 18 fev. 2021.

ZHAO, Liping; ZHANG, Feng; DING, Xiaoying; WU, Guojun; LAM, Yan Y.; WANG, Xuejiao; FU, Huaqing; XUE, Xinhe; LU, Chunhua; MA, Jilin. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. **Science**, v. 359, n. 6380, p. 1151-1156, 9 mar. 2018.

ZHOU, L.; FOSTER, J. A. Psychobiotics and the gut-brain axis: in the pursuit of happiness. **Neuropsychiatr Dis Treat**. v.11, 2015. p.715-23.