

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Alessandra Cristina Marciano Tardelli Ferreira

**INTERFERÊNCIA DO USO DE AMOXICILINA E *Saccharomyces boulardii*
NO PESO E COMPOSIÇÃO CORPORAL DE RATOS**

Sorocaba/SP

2014

Alessandra Cristina Marciano Tardelli Ferreira

**INTERFERÊNCIA DO USO DE AMOXICILINA E *Saccharomyces boulardii*
NO PESO E COMPOSIÇÃO CORPORAL DE RATOS**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Sá Del Fiol

Sorocaba/SP

2014

Alessandra Cristina Marciano Tardelli Ferreira

**INTERFERÊNCIA DO USO DE AMOXICILINA E *Saccharomyces boulardii*
NO PESO E COMPOSIÇÃO CORPORAL DE RATOS**

Dissertação aprovada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre no
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovada em: 18/12/2014

Ass.: _____.

Prof. Dr. Fernando de Sá Del Fiol
Universidade de Sorocaba

Ass.: _____.

Profa. Dra. Marta Maria Duarte Carvalho Vila
Universidade de Sorocaba

Ass.: _____.

Profa. Dra. Mariana B. Villas Boas Álvaro
Universidade Paulista

***Dedico este trabalho ao meu esposo João,
meu filho Rafael e aos meus pais Edgard e
Regina.***

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade de permitir a realização e conclusão deste curso, pois sem ele nada seria possível.

Ao meu esposo João pela compreensão e apoio durante o curso e na vida.

Ao meu pai, Edgard, que me incentivou a realizar este curso e me auxiliou durante todo o percurso dele.

À minha mãe, Regina, pelo apoio e auxílio.

Ao meu tio, Jorge José Marciano, que fez parte desta pesquisa.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando de Sá Del Fiol por aceitar-me como orientanda e imprimir os conceitos acadêmicos com paciência necessária de um grande mestre.

Quando achamos que sabemos as respostas a vida muda as perguntas. Esse é o desafio da vida e da ciência.

RESUMO

A obesidade tornou-se um dos maiores desafios para a saúde pública nos últimos anos, levando a situações de morbimortalidades consideradas graves. Estudos recentes sugerem que a microbiota intestinal modificada por antibióticos, pode desempenhar um importante papel na obesidade e conseqüentemente em desordens metabólicas. Para avaliar a possível interferência da administração do uso de antibiótico associado ou não de *Saccharomyces boulardii* no peso de animais, este estudo utilizou 60 ratos Wistar, por oito semanas, divididos em três grupos experimentais: amoxicilina (n=20), amoxicilina e *Saccharomyces boulardii* (n=20) e o controle (n=20). Os tratamentos foram realizados ao longo de duas semanas nos dias 0, 2, 4, 7, 9 e 11 e realizadas seis administrações a cada grupo. Foram conduzidas análises de impedância bioelétrica tetrapolar (TBIA) e avaliações antropométricas no último dia do experimento (dia 56). O índice de massa corporal foi significativamente menor para os animais do grupo controle (p= 0,034). O mesmo resultado foi encontrado para o índice de Lee; o grupo controle apresentou um índice menor quando comparado com os outros dois grupos que receberam o antibiótico (p=0,0019). A relação da circunferência abdominal/circunferência torácica revelou que o grupo controle apresentou o menor índice (1,19), diferindo do grupo que recebeu amoxicilina isoladamente (p=0,0329), indicando um maior acúmulo de gordura abdominal no grupo que recebeu apenas antibiótico. Os dados referentes à água corporal total mostraram que o grupo controle foi o grupo com a maior quantidade de água corporal (279,1g; p=0,0243). Com relação à composição corporal e acúmulo de gordura, dados antropométricos e TBIA foram homogêneos em mostrar que os grupos tratados com o antibiótico demonstraram um acúmulo de gordura corporal maior do que o grupo controle. Quanto a uma possível proteção sobre as mudanças na microbiota por *Saccharomyces boulardii* associadas ou não ao antibiótico, neste estudo, não houve nenhuma ação protetora, nas condições avaliadas.

Palavras-chaves: Antibióticos. Obesidade. Probióticos.

ABSTRACT

Obesity has become a major public health challenge in recent years and is accompanied by severe medical problems. Recent studies suggest that alterations of the gut microbiota by antibiotics could play an important role in obesity and metabolic disorders. We investigated this topic using 60 Wistar rats, during 8 weeks, which were divided into three experimental groups: amoxicillin, amoxicillin plus *Saccharomyces boulardii* and control. Treatments were administered over the course of two weeks on days 0,2,4,7,9 and 11, with six administrations for each group. Tetrapolar bioelectric impedance analysis (TBIA) and anthropometric evaluations were conducted on last day (day 56). The body mass index was significantly lower for the animals in the control group ($p=0.034$). The same result was observed for the Lee index; the control group had a lower index than the two groups that received antibiotic treatment ($p=0.0019$). The abdominal circumference/thoracic circumference ratio revealed that the control group had the lowest ratio (1.19), which differed from that of the amoxicillin group ($p=0.0329$), indicating a greater accumulation of abdominal fat in the group that received the antibiotic alone. The total body water data demonstrated that the control group had the greatest amount of body water (279.1g) ($p=0.0243$). With respect to body composition and fat accumulation, the anthropometric data and the TBIA were consistent and demonstrated that the groups treated with the antibiotic exhibited a greater accumulation of body fat than the control group. With respect to the potential for protection against changes in microbiota by *S. boulardii*, no microbial protective action was observed in this study, under experimental conditions employed.

Keywords: Antibiotics. Obesity. Probiotics.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1 Obesidade	11
2.2 Interferência do antibiótico na obesidade.....	12
2.3 Interferência do antibiótico na microbiota intestinal	14
2.4 Interferência do probiótico na microbiota intestinal e obesidade	18
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo Geral.....	21
3.2 Objetivos Específicos.....	21
4 RESULTADOS (artigo científico).....	22
5 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXO A – Parecer do comitê de ética.....	43
ANEXO B – Carta de submissão do artigo a revista: Chemotherapy.....	44

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica resultado de um balanço energético positivo, onde a ingestão alimentar é superior ao gasto energético, influenciada por fatores fisiológicos, metabólicos, sociais e culturais (KOTZAMPASSI et al., 2014). Constitui um dos mais graves problemas de saúde pública, por estar acompanhada do desenvolvimento de patologias metabólicas e crônicas, como diabetes melito, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, osteoartrites, câncer entre outras (DELZENNE et al., 2011; MURPHY et al., 2013).

Nos Estados Unidos da América metade da população tem sobrepeso e é, entre os países ricos, o mais afetado pela obesidade, seguido pela Nova Zelândia. Já na América Latina, os mais afetados são México, Argentina, Cuba e Brasil. Na Espanha e na maioria dos países europeus a porcentagem de obesos aumentou entre vinte a quarenta por cento nos últimos dez anos e de forma alarmante na população infantil. A obesidade é hoje considerada uma epidemia mundial (MILLION et al., 2012; RILEY et al., 2013).

A etiologia da obesidade é multifatorial e está, também, associada a fatores genéticos, individuais, ausência de atividade física, bem como fatores ambientais e culturais da vida moderna como alimentos de alto valor calórico, alto teor de gordura e a substituição das atividades humanas por mecanizadas (MILLION et al., 2013; NEWNHAM et al., 2009; RILEY et al., 2013).

Observou-se, recentemente, que a microbiota que coloniza o intestino tem um papel importante no desenvolvimento ou proteção da obesidade e outras enfermidades metabólicas e imunológicas (CHO et al., 2012; NEWNHAM et al., 2009; TRASANDE et al., 2013).

Os autores relatam que alterações na microbiota intestinal, causadas por antibióticos, podem interferir no metabolismo corporal e balanço energético. A este fato denomina-se disbiose (CHO et al., 2012; RILEY et al., 2013).

Estudos recentes determinaram a existência de diferenças da microbiota intestinal entre indivíduos eutróficos e obesos (MILLION et al., 2013; YIN et al., 2010). Um estudo apresentou a confirmação de que uma espécie de bactéria está ligada à obesidade. O trabalho envolveu humanos e, para confirmação

dos resultados, os pesquisadores usaram o mesmo estudo em ratos. Os resultados demonstraram que a manipulação, tanto da dieta como da microbiota intestinal por meio de fármacos, pode representar uma nova estratégia para o tratamento da obesidade e de suas complicações (FEI et al., 2013).

Para a equipe de Jeffrey Gordon, da Universidade de Washington, os microrganismos que povoam o intestino de ratos obesos têm uma maior capacidade de extrair energia dos alimentos, visto que a colonização do intestino estéril de ratos com populações microbióticas de animais obesos aumenta mais as gorduras corporais, do que com microbiota de animais não obesos (TURNBAUGH et al., 2006).

Há mais de cinquenta anos, a microbiota do trato gastrointestinal dos animais de abate tem sido manipulada empiricamente mediante o uso de doses subterapêuticas de antibióticos promotores de crescimento (APC) como aditivos para ganho de peso (CHO et al., 2012).

A proibição dos antibióticos promotores de crescimento, na União Européia, urgiu o desenvolvimento de alternativas que fossem eficazes quanto ao efeito, sobre a produção animal e seguras para a saúde humana, a saúde animal e o meio ambiente (LIN et al., 2013).

As opções para a substituição do uso de antibióticos promotores de crescimento foram surgindo como: ácidos orgânicos, enzimas, extratos vegetais e especialmente os probióticos e os prebióticos. O uso de probióticos em animais de corte modularam a microbiota do trato intestinal, melhoraram a barreira intestinal, os processos metabólicos, imunológicos, e como consequência, diminuíram as enfermidades infecciosas, o estado de bem estar animal e melhoraram a taxa de ganho de peso, ou seja, aumento de massa muscular e não de tecido adiposo (DIBNER et al., 2005; LIN et al., 2014).

Em vista do apresentado, este trabalho buscou informações a respeito dos reflexos do tratamento com antibiótico (amoxicilina) associado ou não ao uso de probiótico (*Saccharomyces boulardii*) no ganho de peso e composição corporal de ratos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Obesidade

O sobrepeso é definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como o índice de massa corporal (IMC) igual ou acima de 25 e abaixo de 30 Kg/m², é um estágio intermediário entre o peso normal e a obesidade. A obesidade é definida, para adultos, como índice de massa corporal igual ou maior que 30 Kg/m² (RILEY; RAPHAEL; FAERSTEIN, 2013), considerada hoje um dos maiores problemas de saúde pública gerando preocupações devido às comorbidades que podem desencadear: diabetes melito, hipertensão arterial sistêmica, desordens respiratórias, doença isquêmica do coração, acidente vascular cerebral, câncer, entre outras (MILLION et al., 2012; MOREIRA et al., 2012; MURPHY et al., 2013).

A obesidade é um estado de inflamação crônica, de caráter subclínico, e tem como consequência complicações metabólicas (SHEN et al., 2013). Esta resposta inflamatória crônica é caracterizada por produção anormal de adipocitocina, ativação de vias de sinalização pró-inflamatórias e a indução de marcadores inflamatórios. A insulina é um anabolizante que sinaliza o grau de adiposidade a médio e longo prazo. O principal indicador de adiposidade é a leptina que sinaliza o estado nutricional e as concentrações de proteína presente no plasma, altamente correlacionados com o número de adipócitos e o teor de gordura (ANGELAKIS et al., 2013).

A prevalência de obesidade aumentou progressivamente entre adultos, adolescentes e crianças, dobrando, desde o ano de 1980, sendo considerada uma epidemia mundial. Dados da Organização Mundial de Saúde mostram que a obesidade afeta mais de 400 milhões de pessoas em todo o mundo e 1,6 bilhões de indivíduos, já estão com sobrepeso. Por volta de 2015, aproximadamente 2,3 bilhões estarão com sobrepeso e mais de 700 milhões serão obesos (GENNE-BACON, 2014).

Há cada vez mais evidências de que a obesidade tem suas origens no início da vida (NEWNHAM et al., 2009). Compreender os mecanismos e caminhos que sustentam as primeiras origens da obesidade é vital para fazer

progressos na resolução deste grande problema da vida moderna (NEWNHAM et al, 2009). A prevenção da obesidade, principalmente na infância, é fundamental pelo grande risco do ser humano se tornar um adulto obeso (VAEL et al., 2011).

Estudos recentes demonstram que alguns indivíduos são mais suscetíveis ao ganho de peso, que outros (MILLION et al., 2012; YIN et al., 2010). Recentemente, descobriu-se que alterações na microbiota intestinal podem interferir diretamente no nosso metabolismo corporal e balanço energético (MILLION et al., 2013; MURPHY et al., 2013; RILEY; RAPHAEL; FAERSTEIN, 2013). Alguns autores identificam o uso de antibióticos como um dos causadores da alteração da microbiota intestinal e, conseqüentemente, responsáveis pelo ganho de peso. (MILLION et al., 2013; MURPHY et al., 2013; RILEY; RAPHAEL; FAERSTEIN, 2013; TRASANDE et al., 2013).

2.2 Interferência dos antibióticos na obesidade

Os antibióticos tem sido prescritos em larga escala em todo o mundo, sendo o uso mais frequente em crianças, por vezes, com emprego abusivo e inapropriado. No entanto, hoje há uma importante preocupação sobre o uso excessivo dos antibióticos e suas conseqüências, entre elas a resistência bacteriana (CHO et al., 2012). Além disso, o uso abusivo de antibióticos também traz como conseqüência as alterações na microbiota intestinal, que se torna pior quando ocorre na infância, pois estas são mais vulneráveis e suscetíveis às mudanças comparado aos adultos (MARQUES et al., 2014; MOREIRA et al., 2012).

O impacto dos antibióticos sobre a composição da microbiota colônica dependerá da concentração da droga no trato digestório, do lúmen intestinal e de seu espectro de ação, podendo provocar vários efeitos indesejáveis, como a indução a colonização por patógenos em potencial, além de influenciar negativamente a atividade metabólica da microbiota gastrintestinal. O retorno ao estado normal da microbiota gastrintestinal ocorre somente trinta dias após o término do tratamento com antimicrobianos (PALONE et al., 2014).

No útero, o bebê é estéril, mas torna-se colonizado precocemente através do contato com a microbiota vaginal, região anal e a cutis materna logo ao nascimento (TRASANDE et al., 2013) e após, compartilhando a microbiota com os outros membros da família. A composição da microbiota depende da idade, sexo, geografia, etnicidade, familiaridade e dieta, e pode ser modulada por antibióticos e ainda, probióticos e prebióticos (MILLION et al., 2012).

Desde a década de 40, há relatos da utilização de antibióticos em doses baixas adicionados à ração animal, a fim de aumentar o ganho de peso em até quinze por cento. Este efeito aumenta a eficiência energética do alimento em aves, porcos e gado (LIBBY; SCHAIBLE, 1955; LIN et al., 2013) e, em particular quando os antibióticos são administrados nos primeiros dias de vida dos animais (TRASANDE et al., 2013).

Com a administração do antibiótico se obtém a alteração da microbiota intestinal, promovendo mudanças na fisiologia do corpo, causando a disbiose (RILEY; RAPHAEL; FAERSTEIN, 2013). Cerca de setenta e cinco por cento dos antibióticos administrados aos animais em confinamento não são absorvidos pelo organismo e, portanto, são excretados através das fezes, contaminando o meio ambiente. Assim, considerando que os seres humanos são de fato expostos cronicamente a antibióticos em baixas dosagens a partir do meio ambiente ou através da exposição a um desses animais contaminados, há uma boa razão para acreditar no ganho de peso e obesidade em indivíduos, em virtude dessa exposição (RILEY; RAPHAEL; FAERSTEIN, 2013).

Outra preocupação com o uso desmedido de antibióticos em animais, como promotores de crescimento, diz respeito à resistência bacteriana. No entanto, os antimicrobianos para este fim foram proibidos para uso em animais na União Européia em 2006, apesar de continuarem a ser utilizados como profilaxia e promotores de crescimento em vários outros países (ANGELAKIS et al., 2013).

O mecanismo pelo qual os agentes antibacterianos afetam o desempenho em relação ao ganho de peso não é bem conhecido, mas várias hipóteses têm sido propostas: (I) nutrientes são eficientemente mais absorvidos por causar um adelgaçamento no epitélio do intestino delgado; (II) os nutrientes

são mais absorvidos, pois os microrganismos concorrentes são reduzidos; (III) os microrganismos responsáveis por infecções subclínicas são reduzidos ou eliminados; (IV) a produção de toxinas ou metabólitos são deprimidas, devido a redução da microbiota intestinal; ou (V) alterações na atividade de enzimas bacterianas melhoram a eficiência na absorção do alimento (THUNY et al., 2010).

Os efeitos de ganho de peso ocasionados pelo uso de antibióticos são observados em muitas classes diferentes de agentes antibacterianos (incluindo macrolídeos, tetraciclina, penicilinas) e isso indica que não depende da classe do antibiótico. Não foram observados tais efeitos com antifúngicos ou antivirais (CHO et al., 2012). Em humanos, um estudo relatou que o uso de azitromicina por tempo prolongado para fibrose cística foi acompanhado de ganho de peso e aumento do índice de massa corporal (IMC) através da melhora na absorção dos nutrientes permitida pela administração do antibiótico (PIRZADA et al., 2003). Muitos estudos tem sido conduzidos com o objetivo de verificar as modificações que o antibiótico ocasiona na microbiota intestinal (CHO et al., 2012; MILLION et al., 2013; PIRZADA et al., 2003).

2.3 Interferência do antibiótico na microbiota intestinal

No corpo humano, temos dez vezes mais bactérias do que células humanas (BELKAID et al., 2014). Grande parte delas vive em nosso sistema gastrointestinal e tem um efeito significativo sobre muitos aspectos da fisiologia humana, incluindo o metabolismo, a absorção de nutrientes e função imunológica (TURNBAUGH et al., 2008; WALSH et al., 2014). Habitam nosso corpo, em torno de 10 a 100 trilhões de microrganismos que povoam o intestino do adulto, sendo que a vasta maioria reside no cólon (MILLION et al., 2012). A distribuição dos microrganismos ao longo do trato gastrointestinal não é homogênea. O ambiente hostil (suco gástrico, bile, suco pancreático, peristaltismo) no estômago e intestino delgado limita o crescimento bacteriano e o número de microrganismos. O íleo é um sítio de transição entre a população bacteriana escassa do jejuno e a população densa e diversificada do cólon. O cólon proporciona condições ótimas para o crescimento de

microrganismos, devido à ausência de secreções digestivas, peristaltismo lento e de abundante suprimento nutricional (MOREIRA et al., 2012). A matriz da microbiota contém setecentos e setenta e cinco diferentes espécies de bactérias intestinais (AGANS et al., 2011).

Os diferentes compartimentos do trato gastrointestinal são habitados por populações de microrganismos. A maior concentração de microrganismos encontra-se no cólon onde ocorre a verdadeira simbiose, chave para o estado de bem estar e saúde (ROBERFROID et al., 2010). Os autores relatam que alterações na microbiota intestinal, causadas por antibióticos, podem interferir no metabolismo corporal e balanço energético. A este fato denomina-se disbiose (CHO et al., 2012; RILEY et al., 2013).

Uma das funções mais importantes da microbiota intestinal consiste na proteção contra a colonização por microrganismos potencialmente patogênicos - “resistência à colonização”, sendo os anaeróbios os principais microrganismos envolvidos nesse processo. Esta resistência está relacionada à competição por substratos, sítios de colonização e à produção de ácidos orgânicos, que inibem o crescimento de muitos outros patógenos. Alguns tipos de bactérias são capazes de produzir bacteriocinas, substâncias semelhantes aos antibióticos, as quais inibem o crescimento bacteriano de algumas espécies e exercem efeito autorregulador sobre as produtoras (PALONE et al., 2014).

A microbiota intestinal desempenha diferentes papéis importantes para o ser humano (AGANS et al., 2011). A microbiota intestinal exerce um efeito trófico no epitélio intestinal, que favorece o desenvolvimento das microvilosidades, que por sua vez, favorecem a absorção de nutrientes (BUTEL et al., 2013; MOREIRA et al., 2012). A influência da microbiota na maturação do sistema imune inato e adaptativo contribui para a homeostase sistêmica e imunológica local o que leva a tolerância à uma variedade de antígenos. A modulação da atividade do sistema imune pode influenciar na função da barreira intestinal (MARQUES et al., 2014; MOREIRA et al., 2012). A capacidade da microbiota de quebrar moléculas não-digeríveis em metabólitos, tais como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e sintetizar vitaminas, demonstra também a sua importância para a nutrição humana (MOREIRA et al., 2012).

Observou-se, recentemente, que a microbiota que coloniza o intestino tem um papel importante no desenvolvimento da obesidade e outras enfermidades metabólicas e imunológicas. Recentemente a microbiota intestinal passou a despertar interesse, pois acreditava-se que essa relação era simplesmente comensal (TURNBAUGH et al., 2008). No entanto, nenhuma atenção foi dada à maioria das bactérias do intestino, cujo papel e a relação com a saúde do hospedeiro permaneceram desconhecidos por muito tempo (BUTEL et al., 2013). Atualmente, cada vez mais os autores relatam as interações benéficas entre essa microbiota comensal e o corpo humano, que ocorrem desde o nascimento (BUTEL et al., 2013).

Abordagens baseadas em sequenciamento de DNA, hoje, revelam que a microbiota intestinal humana compreende mais de 1000 filotipos, sendo capaz, portanto, de identificar as bactérias que residem no intestino do humano. Em indivíduos saudáveis, estas podem ser classificadas em seis divisões bacterianas (filos): Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobactérias, Fusobactérias e Verrucomicrobia (SHEN et al., 2013). As mais abundantes são Firmicutes e Bacteroidetes, em torno de 90% (KOTZAMPASSI et al., 2014; SHEN et al., 2013; WALSH et al., 2014). Em relação ao gênero, os principais constituintes da microbiota intestinal humana são anaeróbios obrigatórios dos gêneros *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium* e *Fusobacterium*, e em menor número anaeróbios facultativos, tais como *Escherichia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus* e *Proteus* (SHEN et al., 2013; XU et al., 2013).

Evidências recentes têm revelado que as microbiotas intestinais de indivíduos obesos e eutróficos são diferentes (TURNBAUGH et al., 2008). Conseguiu-se identificar que as duas bactérias em maior proporção são *Firmicutes* (60-80%), associada ao indivíduo obeso, e a *Bacteroidetes* (20-40%), ao indivíduo eutrófico (MILLION et al., 2013; YIN et al., 2010).

Os mecanismos pelos quais, certos microrganismos, da microbiota intestinal levam ao ganho de peso, ainda são incertos. Muitos estudos trazem a teoria que os microrganismos que povoam o intestino de ratos obesos têm uma maior capacidade de extrair energia dos alimentos, visto que a colonização do intestino estéril de ratos com populações microbianas de ratos obesos

proporciona aumento das gorduras corporais e o ganho de peso, comparado à microbiota de ratos eutróficos (CHO et al., 2012; GORDON et al., 2013; MILLION et al., 2013).

Alguns estudos referem que a microbiota intestinal pode converter carboidrato em ácido graxo de cadeia curta (AGCD). Assim a alta produção de AGCD leva ao aumento da capacidade de extrair maior energia e de obter um maior valor calórico dos alimentos. De fato, os obesos têm uma maior concentração de AGCD nas fezes em comparação aos eutróficos (MUSSO; GAMBINO; CASSADER, 2011). No entanto, é possível que calorias adicionais fornecidas para o hospedeiro a partir da fermentação de moléculas não digeríveis causadas pela microbiota intestinal, são suficientes para produzir mudanças significativas no peso. Um dos argumentos para apoiar essa hipótese é que o consumo de uma dieta rica em fibras pode aumentar a produção de AGCD, desde que o ser humano esteja em disbiose (BACKHED et al., 2004; BUTEL et al., 2013; MUSSO; GAMBINO; CASSADER, 2011).

As bactérias produzem um arsenal de enzimas capazes de quebrar carboidratos em açúcares simples, os quais são fermentados em ácidos graxos de cadeia curta e podem ser absorvidos por células humanas e contribuir com mais de dez por cento das calorias que a nossa própria célula requer (INMAN et al., 2013).

Há, também, na membrana celular das bactérias, lipídios que podem ativar receptores no ser humano. Assim, mesmo quando a bactéria morre, o organismo absorve seus restos e os mesmos podem ativar o crescimento de tecido adiposo (CARVALHO et al., 2013).

A dieta é ainda um dos fatores de maior contribuição para a composição e diversidade da microbiota intestinal. Desde o nascimento, o leite materno é considerado o melhor alimento para a maturação do intestino e, com a introdução de alimentos sólidos, ocorre a seleção das bactérias, formando assim a microbiota do adulto (MARQUES et al., 2014).

2.4 Interferência dos probióticos na microbiota intestinal e obesidade

A palavra probiótico foi utilizada pela primeira vez por Lilly e Stillwellem em 1965, em oposição ao termo antibióticos, para qualificar uma "substância microbiana capaz de estimular o crescimento de um outro microrganismo". Então, a noção de origem microbiana foi introduzida, redefinindo os probióticos como "microrganismos vivos com efeitos benéficos ao hospedeiro, levando ao equilíbrio da sua microbiota intestinal" (BUTEL et al., 2013).

Os probióticos são microrganismos vivos que exercem um benefício à saúde do hospedeiro, estimulam o crescimento de outros microrganismos benéficos, modulam a mucosa intestinal e imunidade sistêmica e melhoram o equilíbrio nutricional e microbiano no trato intestinal (KOTZAMPASSI et al., 2014; MILLION et al., 2013).

Os efeitos benéficos dos probióticos são: 1. Prevenção e/ou redução da duração ou queixa de diarreias induzidas por rotavírus ou associadas a antibióticos, bem como o alívio de queixas devido a intolerância à lactose; 2. A redução da concentração de enzimas que promovem o câncer e / ou metabólitos de putrefação (bacterianas) no intestino; 3. Prevenção e a redução de queixas inespecíficas e irregulares das vias gastrintestinais em pessoas saudáveis; 4. Efeitos benéficos sobre aberrações microbianas, inflamação e outras patologias como: doenças inflamatórias do trato gastrintestinal, infecção por *Helicobacter pylori* ou crescimento excessivo de bactérias; 5. Normalização da passagem das fezes e de sua consistência em indivíduos que sofrem de obstipação ou um cólon irritável; 6. Prevenção ou alívio de alergias e doenças atópicas em crianças; 7. Prevenção de infecções do trato respiratório (resfriado comum, gripe) e outras doenças infecciosas, assim como o tratamento de infecções urogenitais (VRESE; SCHREZENMEIR, 2008).

A utilização terapêutica potencial de microrganismos é feita há quase duzentos anos e é anterior à confirmação experimental da teoria das doenças microbianas. Os mecanismos benéficos dos probióticos ainda não estão claros, mas incluem efeitos não-específicos, tais como a inibição do crescimento de patógenos, de alteração da composição de ácidos graxos de cadeia curta no lumen intestinal, estimulação da produção de mucina do cólon, ou

potencialização da resposta imunológica e secretora da atividade antibiótica (ANGELASKIS et al., 2013).

Uma das primeiras recomendações para o uso de probióticos foi como tratamento e/ou prevenção de diarreia. Os autores da recente meta-análise através de sessenta e três (63) ensaios clínicos relataram um significativo benefício dos probióticos no tratamento da diarreia aguda, com duração encurtada para um dia na diarreia que persiste por mais de quatro dias, além da diminuição de sua frequência (ALLEN et al., 2010).

Foi relatada também a habilidade de probióticos em inibir patógenos como prevenção ou tratamento das diarreias associadas ao uso de antibióticos e na diarreia dos viajantes. Além disso, probióticos diminuem a incidência de diarreias associadas ao *Clostridium difficile* e pode melhorar os sintomas da síndrome do intestino irritável e doença inflamatória intestinal (ANGELASKIS et al., 2013).

Por décadas, os probióticos tem sido usados na pecuária, em animais de abate, por seus efeitos de promoção do crescimento e usados desde a proibição dos antibióticos como promotores de crescimento na Europa a partir de 1º de janeiro de 2006 (TURNBAUGH et al., 2008). O uso destes probióticos em animais de abate modulam a microbiota do trato intestinal, melhoram a barreira intestinal, os processos metabólicos, imunológicos e, como consequência, diminuem as enfermidades infecciosas e levam ao ganho de peso, aumentando a massa muscular e não o tecido adiposo (DIBNER et al., 2005; LIN et al., 2014).

As bactérias mais comumente utilizadas pertencem aos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* e *Streptococcus*. As mais significativas são a *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (MILLION et al., 2012).

Os *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus reuteri* são os mais comumente utilizados na pecuária. Sugere-se que probióticos contendo *Lactobacillus* podem ter impacto na alteração do peso em seres humanos e animais (MILLION et al., 2012). Os *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus ingluviei* foram associados ao ganho de peso, enquanto *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus gasseri*, à perda de peso (TURNBAUGH et al., 2008; MILLION et al., 2012; ANGELAKIS et al., 2013).

A *Bifidobacterium* é uma bactéria comensal, encontrada em maior número no intestino dos mamíferos (YIN et al., 2010). É a primeira bactéria a colonizar o intestino do recém-nascido (AGANS et al., 2011; KOTZAMPASSI et al., 2014). Demonstrou-se neste estudo citado, duas cepas de *Bifidobacterium* com propriedades antagonistas, a *Bifidobacterium* L66-5, que aumenta a produção de *Bacteroidetes* e, como resultado, a perda de peso. Já, a presença de *Bifidobacterium* M13-4 está relacionada ao ganho de peso por melhorar a absorção de gordura no lúmen intestinal (YIN et al., 2010).

A *Bifidobacterium* ainda pode auxiliar a cepa de *Bacteroidetes* a degradar polissacarídeos e inibir a absorção de colesterol exógeno na porção do intestino delgado, auxiliando assim a redução dos níveis séricos de colesterol. Existem diversas pesquisas que demonstram o efeito positivo de *Lactobacillus* e hipocolesteremia; este estudo mostra que uma cepa de *Bifidobacterium longum* exibiu um dos efeitos mais significativos na redução do colesterol total no soro, tanto em ratos como em seres humanos (YIN et al., 2010).

A administração de *Saccharomyces boulardii* em ratos apresentou resposta favorável em relação à redução do peso, da massa adiposa, da esteatose hepática e do grau de inflamação. Portanto, pode-se concluir que o *S. boulardii* tem uma ação benéfica como probiótico no tratamento da obesidade (EVERARD et al., 2014).

Em geral, tanto os probióticos ingeridos, como os comensais, são importantes e determinantes ao favorecimento da obesidade ou a perda de peso, e possivelmente diversos produtos comercializados com probióticos estão sendo consumidos sem saber seu real objetivo (MILLION et al., 2013). Em contrapartida, a melhor compreensão da capacidade das bactérias probióticas em levar à perda de peso é importante, pois seria uma nova alternativa de tratamento no combate à obesidade (ANGELAKIS et al., 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a interferência do uso do antibiótico (amoxicilina) associado ou não ao uso do probiótico (*Saccharomyces boulardii*) no peso e composição corporal de ratos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar as variações nas medidas antropométricas e de bioimpedância dos animais após os tratamentos empregados.

Avaliar a suposta proteção oferecida pelo probiótico (*Saccharomyces boulardii*) no ganho de peso e composição corporal de ratos.

4 RESULTADOS

TITLE PAGE

Title: Obesity and the use of antibiotics and probiotics in rats

Authors:

Fernando de Sá Del Fiol Ph.D.^{1*}

Alessandra Cristina Marciano Tardelli Ferreira, M.D.¹

Jorge José Marciano, D.D.¹

Maria Claudia Marques, Prof.¹

Luciane Lopes Sant'Ana, N.D.¹

¹Pharmacology Dept., University of Sorocaba, Rodovia Raposo Tavares, Km 92,5
Sorocaba, SP, Brazil

Keywords: antibiotics, obesity, probiotics

Statement: We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

Corresponding author:*Prof. Dr. Fernando de Sá Del Fiol. Universidade de Sorocaba Rodovia Raposo Tavares, Km 92,5 CEP: 18023-000 Telephone: 55 15 996170589 Fax: 55 15 21017074 E-mail: fernando.fiol@prof.uniso.br

ABSTRACT

Obesity has become a major public health challenge in recent years and is accompanied by severe medical problems. Recent studies suggest that alterations of the gut microbiota by antibiotics could play an important role in obesity and metabolic disorders. We investigated this topic using 60 Wistar rats, which were divided into three experimental groups: amoxicillin, amoxicillin plus *Saccharomyces boulardii* and control. Treatments were administered over the course of two weeks on days 0,2,4,7,9 and 11, with six administrations for each group. Tetrapolar bioelectric impedance analysis (TBIA) and anthropometric evaluations were conducted. The body mass index was significantly lower for the animals in the control group ($p=0.034$). The same result was observed for the Lee index; the control group had a lower index than the two groups that received antibiotic treatment ($p=0.0019$). The abdominal circumference/thoracic circumference ratio revealed that the control group had the lowest ratio (1.19), which differed from that of the amoxicillin group ($p=0.0329$), indicating a greater accumulation of abdominal fat in the group that received the antibiotic alone. The total body water data demonstrated that the control group had the greatest amount of body water (279.1g) ($p=0.0243$). With respect to body composition and fat accumulation, the anthropometric data and the TBIA were consistent and demonstrated that the groups treated with the antibiotic exhibited a greater accumulation of body fat than the control group. With respect to the potential for protection against changes in microbiota by *S. boulardii*, no microbial protective action was observed in this study.

Keywords: antibiotics, obesity, probiotics

Introduction

Obesity has become a major public health challenge in recent years and is now being treated as a true pandemic, particularly in Western countries [1]. In addition to the difficulties in locomotion that are caused by obesity, the severe medical problems that accompany this disease include diabetes, hypertension, dyslipidemia [2].

The multifactorial etiology of obesity is linked to an individual's unique factors, such as genetic background and physical activity, and to environmental and cultural factors associated with modern life, such as high-caloric food, high-fat diets and the gradual replacement of human activities by mechanized activities [2, 3].

To better understand the role of the gut microbiota in this disease, scientists recently began to evaluate the possibility that antibiotic-induced changes in the intestinal microbiota could interfere directly with body metabolism and energy balance [1, 2, 4]. Some authors referred to this change in intestinal microbiota as dysbiosis, and many studies attributed these changes to antibiotics. The emergence of dysbiosis may be a possible explanation for the occurrence of a worldwide epidemic of obesity [2, 5-7].

Since the 1940s, antibiotics have been added to animal feed in low doses to increase weight gain. This process increases the efficiency of feeding poultry, pigs and cattle [8-11], particularly when the antibiotics are administered in the first days of an animal's life [6].

Babies acquire their microbiota in early life via contact with contaminated surfaces, such as maternal vaginal surfaces, fecal microbiota [12] and other family members. The composition of the microbiota varies and is highly susceptible to changes during childhood. A level of stability is acquired in adulthood and is affected by age [13, 14], sex [15], geography [16], diet [17] and environmental factors, such as early exposure to antibiotics [6].

The administration of antibiotics to children during childhood and associated alterations in gut microbiota (i.e., dysbiosis) could be responsible for the significant increases observed in the indicators of childhood and adult obesity [18]. This phenomenon has been the focus of numerous studies that demonstrated that a significant

direct relationship exists between the use of antibiotics in childhood and the emergence of obesity [2, 5-7, 17, 19].

To obtain more information and search for potential probiotic-based treatments, this study evaluated the interference of the administration of amoxicillin in the presence and absence of probiotics with the weight and body composition of rats.

Methods

Animal Care: Sixty male Wistar rats with an age of 12 days were used. The animals were received at the University of Sorocaba Vivarium and were allowed to adapt to the experimental conditions for 10 days. A standard laboratory rodent diet (Presence[®]) and water were provided *ad libitum*.

The project was approved by the University of Sorocaba Ethics Committee on Animal Research (number 010/2013) and was conducted in accordance with the Brazilian Regulations for Animal Experimentation. The animals were housed in cages under an alternating 12-hour light/dark cycle. The room temperature was maintained at 22°C.

The 60 animals were divided into three experimental groups: Group AMOX received amoxicillin (n=20), Group AMOX+SB received amoxicillin plus *Saccharomyces boulardii* (n=20) and Group CONTR contained the controls (n=20).

Treatments: Group AMOX received 150 mg/kg of amoxicillin *per os* as a single daily dose. Group AMOX+SB received 150 mg/kg of amoxicillin *per os* and 0.1 mL of a suspension of *S. boulardii* (2.8×10^6 c.f.u.) 2 hours later. Both treatments were administered as a single daily dose. Group CONTR received 0.1 mL of 0.9% NaCl as a single daily dose. Amoxicillin was used because it is the most widely used antibiotic in childhood, when the microbiota is more susceptible to change. The dose used was the maximum allowed in children[20].

The treatments were administered over the course of two weeks on days 0, 2, 4, 7, 9 and 11, with a total of six administrations for each group. The

lyophilized *S. boulardii* cells were dissolved in saline (i.e., 0.9% NaCl) for administration to the animals. *S. boulardii* was used as microbiota repositon because of its widespread use in children.[21]

Weight gain evaluation: To evaluate weight gain, the animals were weighed weekly for 8 weeks, on days 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 and 56.

Assessment of body composition: To assess body composition, the animals underwent anthropometry and bioelectrical impedance testing.

Bioelectrical impedance: Tetrapolar bioelectric impedance analysis (TBIA) was performed according to the procedure described by Hall et al [22]. Whole body reactance (WBXc) and whole body resistance (WBR) were measured using a tetrapolar phase-sensitive bioelectrical impedance analyzer that introduced a 425 μ A current at 50 KHz (Bioelectrical Body Composition Analyzer, Model: Quantum II). The animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (30 mg/Kg) and placed in the prone position on a non-conductive plastic surface. The hair was removed, and four electrodes (i.e., two sources and two detectors) made from hypodermic needles were placed as described by Hall et al [22] and Yokoi et al [23]. Electrode 1 (i.e., a source) was placed at the anterior edge of the orbit, electrode 2 (i.e., a source) was placed 4 cm from the base of the tail, electrode 3 (i.e., a detector) was placed at the anterior opening of the pinna and electrode 4 (i.e., a detector) was placed at the mid-pelvis of the rats.

Anthropometrical determinations: For anthropometric evaluation of the animals, the following measurements were made, as described by Novelli et al [24]: abdominal circumference (AC) was measured immediately anterior to the forefoot, thoracic circumference (TC) was measured immediately behind the foreleg and body length (BL) was measured as the nose–anus length. The anthropometrical measurements were made using a plastic, non-extensible measuring tape, with an accuracy of 0.1 cm. All measurements were made on anaesthetized animals after TBIA.

Using the data obtained from TBIA (i.e., WBXc and WBR) and anthropometry (i.e., AC, TC and BL) and the animal weights (i.e., AW), we evaluated the following parameters for all animals:

- the body mass index (BMI) was calculated by dividing the weight of the animal in g (AW) by the square of its length in cm (BL) [24].

- the Lee index was determined by dividing the cubic root of the animal weight in g (AW) by the length in cm (BL) [25].

- the AC/TC ratio was determined by dividing the AC in cm by the TC in cm.

- the total body water in g (TBW) was estimated as follows, using the empirical formula described by Hall et al [22]: $TBW = 15.47 + 97.44 \text{ BL}^2/\text{WBR}$, where BL is body length in cm and WBR is WBR in Ω from the TBIA.

- the percentage of body water (% BW) was calculated by dividing the TBW in g by the animal weight in g (AW). The result was multiplied by 100 to obtain a percentage.

Statistical Analysis

All measurements were performed in duplicate. The statistical significance of differences among the three groups was evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey-Kramer test. A difference between groups was considered statistically significant when the p value was <0.05 .

Results

Weight gain: The animals were weighed weekly. Table 1 shows the mean initial weight (i.e., day zero), the mean final weight (i.e., day 56) and the mean weight gain (g) of the studied groups. Although we observed a higher rate of weight gain in the group AMOX+SB, this result was not statistically significant ($p=0.13$). Figure 1 shows the mean weekly weight gain for all of the groups. Interestingly, the two groups that received antibiotic treatment (i.e., AMOX and AMOX+SB) gained less weight in the first two weeks than the CONTR group. However, this difference was not statistically significant ($p=0.504$). This tendency was reversed after the third week, when the control group began to gain less weight. Interestingly, of all of the weeks studied, a significant difference in the weekly weight gain of the animals was observed

only in the last week (i.e., Week 8), when the CONTR group gained less weight (15.15 g) than the groups receiving amoxicillin ($p=0.0134$).

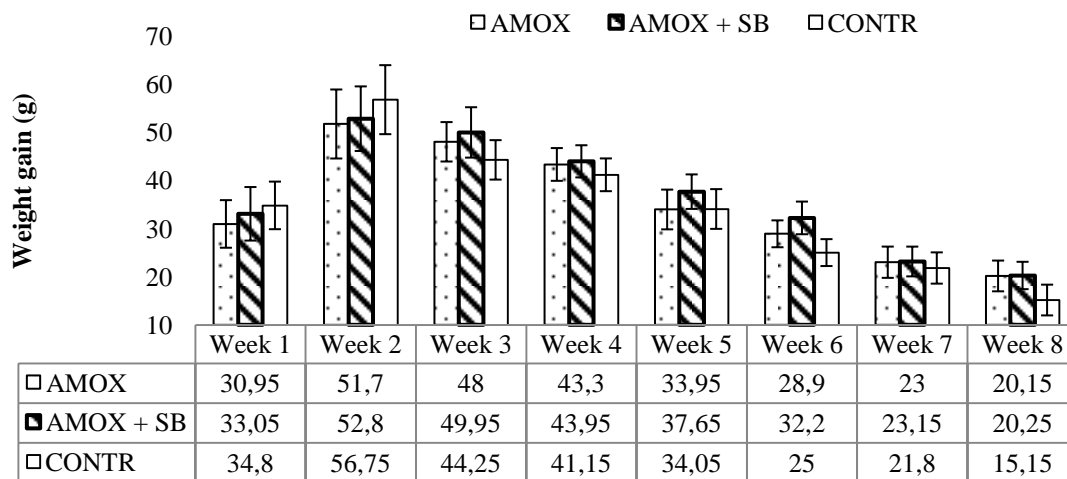
Table 1. Initial weight, final weight and weight gain of animals (mean) (g), according to the treatment employed in the AMOX, AMOX+SB and CONTR groups.

	AMOX	AMOX+SB	CONTR
Initial weight (g)	101.05 (± 9.68) ^a	103.75 (± 8.09) ^a	102.15 (± 8.72) ^a
Final weight (g)	381.00 (± 6.80) ^a	396.75 (± 8.71) ^a	375.10 (± 8.47) ^a
Weight gain (g)	279.95 (± 26.16) ^a	293.00 (± 35.25) ^a	272.95 (± 32.86) ^a

Different superscripted letters indicate statistical significance $p < 0.05$.

Equal superscripted letters indicate no statistical significance $p > 0.05$.

Figure 1. Mean weekly gain weight (g) for the AMOX, AMOX+SB and CONTR groups.



Body composition

Table 2. TBIA data for the AMOX, AMOX+SB and CONTR groups.

	AMOX	AMOX+ SB	CONTR	p
Whole Body Reactance (WBXc)	25.77 (± 5.41) ^a	21.94 (± 8.82) ^a	25.30 (± 9.60) ^a	0.2889
Whole Body Resistance (WBR)	267.72 (± 42.46) ^a	257.95 (± 65.00) ^a	258.97 (± 29.45) ^a	0.7819

Different superscripted letters indicate statistical significance $p < 0.05$.

Identical superscripted letters indicate the absence of statistical significance $p > 0.05$.

Table 2 shows the results of the TBIA. No differences were observed among the groups.

Table 3. BMI, Lee index, AC/TC ratio, TBW and BW in the AMOX, AMOX+SB and CONTR groups.

	AMOX	AMOX+ SB	CONTR	p
BMI (g/cm ²)	0.599 (\pm 0.053) ^a	0.606 (\pm 0.072) ^a	0.544 (\pm 0.055) ^b	0.0034
Lee index	0.287 (\pm 0.011) ^a	0.286 (\pm 0.013) ^a	0.274 (\pm 0.011) ^b	0.0019
AC/TC ratio	1.254 (\pm 0.090) ^a	1.250 (\pm 0.054) ^{a,b}	1.199 (\pm 0.066) ^b	0.0329
TBW (g)	252.95 (\pm 39.90) ^a	252.61 (\pm 17.73) ^a	279.12 (\pm 38.88) ^b	0.0243
BW (%)	66.32 (\pm 8.64) ^a	63.84 (\pm 5.99) ^a	74.96 (\pm 11.70) ^b	0.0012

Different superscripted letters indicate statistical significance $p < 0.05$.

Identical superscripted letters indicate the absence of statistical significance $p > 0.05$.

The data presented in Table 3 are the results obtained from anthropometry and TBIA. The BMI was significantly lower for the animals in the CONTR group. The same result was observed for the Lee index, for which the group that received no antibiotic treatment (i.e., CONTR) exhibited a lower value ($p = 0.0019$) than the two groups that received the antibiotic (i.e., AMOX and AMOX + SB).

With respect to the AC/TC ratio, the results demonstrate that the CONTR group had the lowest value (1.199) and that this value differed from that of the AMOX group ($p = 0.0329$). The AC/TC ratio indicates that a greater accumulation of abdominal fat occurred in the group that received amoxicillin alone [24, 26].

The TBW data demonstrate that although the CONTR group exhibited the lowest average weight gain (272.95 g) and the lowest final weight (375.10 g), this group had the greatest amount of body water (279.1 g) ($p = 0.0243$). When evaluating the percentage of water in the bodies of the animals, this difference was even greater ($p = 0.0012$).

In the CONTR group, 74.96% of the body weight was water, while the AMOX and AMOX+SB groups exhibited body water percentages of 66.32% and

66.84%, respectively ($p=0.0012$). The BW data demonstrate very clearly that a greater fat-free mass existed in the group that did not receive amoxicillin [27, 28].

Discussion

With respect to the weight gain of the animals, this study demonstrated that less weight gain occurred in the first two weeks for the group that received amoxicillin (Figure 1). This loss is explained by the diarrhea experienced during those two weeks by the animals who received the antibiotic (i.e., AMOX and AMOX+BD). From the third week on, there was an inversion and the groups that received the antibiotic began gain more weight. In Week 8, this result became even more significant ($p=0.0134$).

Although some authors reported similar results (i.e., changes in body composition occurred without weight changes [5, 29, 30]), the data from this study suggest that weight changes could appear in subsequent weeks if the study was extended. This prediction is plausible because in Week 8, significant differences were observed between the groups that used amoxicillin and those that did not. Other studies found similar responses, in which animals and humans treated with antibiotics gained weight, particularly in cases in which the antibiotics were administered early in life [6, 31-33].

With respect to body composition and fat accumulation, the anthropometric data (i.e., BMI, Lee index and AC/TC ratio) and the TBIA data (i.e., TBW and BW) were consistent and demonstrated that the groups that were treated with amoxicillin exhibited a larger accumulation of body fat than the CONTR group.

The literature has reported this effect for years, since the first use of antibiotics [34, 35] as growth promoters in chickens, piglets and calves. This effect was discovered in the United States in 1946, when chickens were fed tetracycline derivatives [36].

Although some studies demonstrated the effectiveness of *S. boulardii* for resetting alterations caused by antibiotic treatment [21, 37, 38] we found no microbial protective effects in this study; the results of the group that received *S. boulardii* were identical to those of the group that received amoxicillin alone (i.e., an increase in body fat was observed).

Other studies demonstrated the anti-obesity effect of microorganisms such as *Bifidobacterium animalis* and *Lactobacillus* species [39, 40], but this effect was not replicated with *S. boulardii* in the present study.

Recent studies of humans and animals provided increasing evidence for a strong association between the consumption of antibiotics and weight gain and demonstrated a significant role of the human microbiota in this process [5, 6, 41-45]. Studies of microbiota transplantation demonstrated that germ-free animals accumulated less fat, despite eating more. After receiving transplanted microbiota from obese animals, these animals gained more weight in fat [46, 47].

The role of the microbiota in obesity and the interference of antibiotics with the microbiota are well documented. More studies that manipulate the microbiota with probiotics and prebiotics are needed to create a new front for the treatment of obesity.

References

1. Murphy EF, Clarke SF, Marques TM, Hill C, Stanton C, Ross RP, O'Doherty RM, Shanahan F, Cotter PD: **Antimicrobials: Strategies for targeting obesity and metabolic health?** *Gut Microbes* 2013, **4**:48-53.
2. Riley LW, Raphael E, Faerstein E: **Obesity in the United States - dysbiosis from exposure to low-dose antibiotics?** *Front Public Health* 2013, **1**:69.
3. Newnham JP, Pennell CE, Lye SJ, Rampono J, Challis JR: **Early life origins of obesity.** *Obstet Gynecol Clin North Am* 2009, **36**:227-244, xii.
4. Million M, Lagier JC, Yahav D, Paul M: **Gut bacterial microbiota and obesity.** *Clin Microbiol Infect* 2013, **19**:305-313.
5. Cho I, Yamanishi S, Cox L, Methe BA, Zavadil J, Li K, Gao Z, Mahana D, Raju K, Teitler I, et al: **Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity.** *Nature* 2012, **488**:621-626.
6. Trasande L, Blustein J, Liu M, Corwin E, Cox LM, Blaser MJ: **Infant antibiotic exposures and early-life body mass.** *Int J Obes (Lond)* 2013, **37**:16-23.
7. Ajslev TA, Andersen CS, Gamborg M, Sorensen TI, Jess T: **Childhood overweight after establishment of the gut microbiota: the role of delivery mode, pre-pregnancy weight and early administration of antibiotics.** *Int J Obes (Lond)* 2011, **35**:522-529.
8. Libby DA, Schaible PJ: **Observations on growth responses to antibiotics and arsonic acids in poultry feeds.** *Science* 1955, **121**:733-734.
9. Gaskins HR, Collier CT, Anderson DB: **Antibiotics as growth promotants: mode of action.** *Anim Biotechnol* 2002, **13**:29-42.
10. Lin J: **Antibiotic growth promoters enhance animal production by targeting intestinal bile salt hydrolase and its producers.** *Front Microbiol* 2014, **5**:33.

11. Lin J, Hunkapiller AA, Layton AC, Chang YJ, Robbins KR: **Response of intestinal microbiota to antibiotic growth promoters in chickens.** *Foodborne Pathog Dis* 2013, **10**:331-337.
12. Reinhardt C, Reigstad CS, Backhed F: **Intestinal microbiota during infancy and its implications for obesity.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009, **48**:249-256.
13. Agans R, Rigsbee L, Kenche H, Michail S, Khamis HJ, Paliy O: **Distal gut microbiota of adolescent children is different from that of adults.** *FEMS Microbiol Ecol* 2011, **77**:404-412.
14. Vael C, Verhulst SL, Nelen V, Goossens H, Desager KN: **Intestinal microflora and body mass index during the first three years of life: an observational study.** *Gut Pathog* 2011, **3**:8.
15. Markle JG, Frank DN, Mortin-Toth S, Robertson CE, Feazel LM, Rolle-Kampczyk U, von Bergen M, McCoy KD, Macpherson AJ, Danska JS: **Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity.** *Science* 2013, **339**:1084-1088.
16. Grzeskowiak L, Collado MC, Mangani C, Maleta K, Laitinen K, Ashorn P, Isolauri E, Salminen S: **Distinct gut microbiota in southeastern African and northern European infants.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012, **54**:812-816.
17. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI: **Host-bacterial mutualism in the human intestine.** *Science* 2005, **307**:1915-1920.
18. Bibiloni MD, Pons A, Tur JA: **Prevalence of Overweight and Obesity in Adolescents: A Systematic Review.** *ISRN Obes* 2013, **2013**:392747.
19. Ternak G: **Antibiotics may act as growth/obesity promoters in humans as an inadvertent result of antibiotic pollution?** *Med Hypotheses* 2005, **64**:14-16.
20. Eliopoulos DNGRCMJGM: *The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy 2013.* 43 edn. Sperryville: Antimicrobial Therapy; 43 edition (April 2013) 2013.

21. Shan LS, Hou P, Wang ZJ, Liu FR, Chen N, Shu LH, Zhang H, Han XH, Han XX, Cai XX, et al: **Prevention and treatment of diarrhoea with *Saccharomyces boulardii* in children with acute lower respiratory tract infections.** *Benef Microbes* 2013, **4**:329-334.
22. Hall CB, Lukaski HC, Marchello MJ: **Estimation of rat body composition using tetrapolar bioelectrical impedance analysis.** *Nutr Rep Int* 1989, **39**:627-633.
23. Yokoi K, Lukaski HC, Uthus EO, Nielsen FH: **Use of bioimpedance spectroscopy to estimate body water distribution in rats fed high dietary sulfur amino acids.** *J Nutr* 2001, **131**:1302-1308.
24. Novelli EL, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Mani F, Fernandes AA, Cicogna AC, Novelli Filho JL: **Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats.** *Lab Anim* 2007, **41**:111-119.
25. Bernardis LL: **Prediction of carcass fat, water and lean body mass from Lee's "nutritive ratio" in rats with hypothalamic obesity.** *Experientia* 1970, **26**:789-790.
26. Gerbaix M, Metz L, Ringot E, Courteix D: **Visceral fat mass determination in rodent: validation of dual-energy X-ray absorptiometry and anthropometric techniques in fat and lean rats.** *Lipids Health Dis* 2010, **9**:140.
27. Morbach CA, Brans YW: **Determination of body composition in growing rats by total body electrical conductivity.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992, **14**:283-292.
28. Lesser GT, Deutsch S, Markofsky J: **Fat-free mass, total body water, and intracellular water in the aged rat.** *Am J Physiol* 1980, **238**:R82-90.
29. Morel FB, Oosting A, Piloquet H, Oozeer R, Darmaun D, Michel C: **Can antibiotic treatment in preweaning rats alter body composition in adulthood?** *Neonatology* 2013, **103**:182-189.

30. Sheng HP, Huggins RA: **A review of body composition studies with emphasis on total body water and fat.** *Am J Clin Nutr* 1979, **32**:630-647.
31. Mozes S, Sefcikova Z, Bujnakova D, Racek L: **Effect of antibiotic treatment on intestinal microbial and enzymatic development in postnatally overfed obese rats.** *Obesity (Silver Spring)* 2013, **21**:1635-1642.
32. Southern KW, Barker PM, Solis-Moya A, Patel L: **Macrolide antibiotics for cystic fibrosis.** *Cochrane Database Syst Rev* 2012, **11**:CD002203.
33. Garly ML, Bale C, Martins CL, Whittle HC, Nielsen J, Lisse IM, Aaby P: **Prophylactic antibiotics to prevent pneumonia and other complications after measles: community based randomised double blind placebo controlled trial in Guinea-Bissau.** *BMJ* 2006, **333**:1245.
34. Dibner JJ, Richards JD: **Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action.** *Poult Sci* 2005, **84**:634-643.
35. Koluman A, Dikici A: **Antimicrobial resistance of emerging foodborne pathogens: status quo and global trends.** *Crit Rev Microbiol* 2013, **39**:57-69.
36. Moore PR, Evenson A, et al.: **Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick.** *J Biol Chem* 1946, **165**:437-441.
37. Szajewska H, Mrukowicz J: **Meta-analysis: non-pathogenic yeast *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea.** *Aliment Pharmacol Ther* 2005, **22**:365-372.
38. Kotowska M, Albrecht P, Szajewska H: ***Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: a randomized double-blind placebo-controlled trial.** *Aliment Pharmacol Ther* 2005, **21**:583-590.
39. Yin YN, Yu QF, Fu N, Liu XW, Lu FG: **Effects of four *Bifidobacteria* on obesity in high-fat diet induced rats.** *World J Gastroenterol* 2010, **16**:3394-3401.

40. Million M, Angelakis E, Paul M, Armougom F, Leibovici L, Raoult D: **Comparative meta-analysis of the effect of Lactobacillus species on weight gain in humans and animals.** *Microb Pathog* 2012, **53**:100-108.
41. Thuny F, Richet H, Casalta JP, Angelakis E, Habib G, Raoult D: **Vancomycin treatment of infective endocarditis is linked with recently acquired obesity.** *PLoS One* 2010, **5**:e9074.
42. Pirzada OM, McGaw J, Taylor CJ, Everard ML: **Improved lung function and body mass index associated with long-term use of Macrolide antibiotics.** *J Cyst Fibros* 2003, **2**:69-71.
43. Saiman L, Anstead M, Mayer-Hamblett N, Lands LC, Kloster M, Hocevar-Trnka J, Goss CH, Rose LM, Burns JL, Marshall BC, Ratjen F: **Effect of azithromycin on pulmonary function in patients with cystic fibrosis uninfected with Pseudomonas aeruginosa: a randomized controlled trial.** *JAMA* 2010, **303**:1707-1715.
44. Ng YY, Su PH, Chen JY, Quek YW, Hu JM, Lee IC, Lee HS, Chang HP: **Efficacy of intermediate-dose oral erythromycin on very low birth weight infants with feeding intolerance.** *Pediatr Neonatol* 2012, **53**:34-40.
45. Lane JA, Murray LJ, Harvey IM, Donovan JL, Nair P, Harvey RF: **Randomised clinical trial: Helicobacter pylori eradication is associated with a significantly increased body mass index in a placebo-controlled study.** *Aliment Pharmacol Ther* 2011, **33**:922-929.
46. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI: **The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:15718-15723.
47. Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JI: **Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome.** *Cell Host Microbe* 2008, **3**:213-223.

5 CONCLUSÕES

Com base na metodologia proposta e nas condições nas quais o estudo foi realizado, pode-se concluir:

1. O uso da amoxicilina interferiu na composição corporal de ratos, aumentando a proporção de gordura corporal;
2. O uso do *Saccharomyces boulardii* não demonstrou efeito protetor em relação a alterações na composição corporal dos animais.
3. O uso de amoxicilina, associada ou não ao *Saccharomyces boulardii* não interferiu, de forma significativa, no peso dos animais tratados.
4. O uso de *Saccharomyces boulardii* não interferiu na composição corporal dos animais.

REFERÊNCIAS

AGANS, R. *et al.* Distal gut microbiota of adolescent children is different from that of adults. **FEMS Microbiol Ecol**, Dayton, v. 77, n. 2, p. 404-12, 2011.

ALLEN, S.J. *et al.* Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. **Cochrane Database Syst Rev**, Oxford, v. 10, n. 11, 2010.

ANGELAKIS, E. *et al.* Related actions of probiotics and antibiotics on gut microbiota and weight modification. **Lancet Infect Dis**, Marselha, vol. 13, p. 889–99, 2013.

BACKHED, F. *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Toronto, v.101, n.44, p. 15718-23, 2004.

BELKAID, Y.; HAND, T.W. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. **Leading Edge**, Bethesda, v.157, n.1, p.121-41, 2014.

BIBLIONI, M. D. M. *et al.* Prevalence of Overweight and Obesity in Adolescents: A Systematic Review. **ISRN Obesity**, Santiago de Compostela, 2013.

BUTEL, M.J. *et al.* Probiotics, gut microbiota and health. **Science Direct**, Paris, v. 44, n. 1, p. 1-8, 2013.

CARNAHAN, S. *et al.* Prebiotics in obesity. **Panminerva Med.**, Australia, v. 56, n. 2, p.165-75, 2014.

CARVALHO, B. M. ; SAAD, M. J. A. Influence of gut microbiota on subclinical inflammation and insulin resistance. **Mediators of Inflammation**, Campinas, v. 2013, p. 1-13, 2013.

CHO, I. *et al.* Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. **Nature**, New York, v. 488, n. 7413, p. 621-6, 2012.

DELZENNE, N. M. *et al.* Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic properties: consequences for host health in the context of

obesity and metabolic syndrome. **Microb Cell Fact**, Brussels, v.10, n. 1, 2011.

DIBNER, J.J.; RICHARD, J.D. Antibiotic Growth Promoters in Agriculture: History and Mode of Action. **Poultry Science**, Missouri, v. 84, p. 634–643, 2005.

EVERARD, A. *et al.* *Saccharomyces boulardii* administration changes gut microbiota and reduces hepatic steatosis, low-grade inflammation, and fat mass in obese and type 2 diabetic *db/db* mice. **MBio**. Brussels, v. 5, n. 3, p. 1011-14, 2014.

EVERARD, A. *et al.* Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity. **ISME J**. London, apr. 2014.

FEI, N.; ZHAO, L. An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germ free mice. **The ISME Journal**, Shanghai, v.7, p. 880–884, 2013.

GENNE-BACON, E. A. *et al.* Thinking Evolutionarily About Obesity. **Yale J Biol Med**, New Haven, Connecticut, v.87, n.2, p. 99-112, 2014.

GORDON, J.I. *et al.* Cultured gut microbiota from twins discordant for obesity modulate adiposity and metabolic phenotypes in mice. *Science*, Washington, v. 341, n. 6150, 2013.

INMAN, M. How Bacteria Turn Fiber into Food. *Plos Biology*, Berkeley, v.9, n.12, dez. 2013.

KELESIDIS T., POTHOUKAKIS C. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. **Ther Adv Gastroenterol** , n.5, ed. 2, p.111–125, 2012.

KOTOWSKA M, ALBRECHT P, SZAJEWSKA H. *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: a randomized double-blind placebo-controlled trial. **Aliment Pharmacol Ther**, v.21, p.583-90, 2005.

KOTZAMPASSI, K. *et al.* Obesity as a Consequence of Gut Bacteria and Diet Interactions. **ISRN Obesity**, Athens, v.2014, p. 1-8, 2014.

LIBBY, D. A.; SCHAIBLE, P. J. Observations on growth responses to antibiotics and arsonic acids in poultry feeds. **Science**, v.121, n.3151, p. 733-4, 1955.

LIN, J. Antibiotic growth promoters enhance animal production by targeting intestinal bile salt hydrolase and its producers. **Front Microbiol**, Lausanne, v.5, n. 33, 2014.

LIN, J. *et al.* Response of intestinal microbiota to antibiotic growth promoters in chickens. **Foodborne Pathog Dis**, Knoxville, v.10, n.4, p. 331-7, 2013.

LIN, J. Effect of antibiotic growth promoters on intestinal microbiota in food animals: a novel model for studying the relationship between gut microbiota and human obesity? **Front Microbiol.**, Knoxville, v.2, n. 53., 2011.

MARQUES, T.M. *et al.* Gut microbiota modulation and implications for host health: Dietary strategies to influence the gut–brain axis. **Innovative Food Science and Emerging Technologies.**, Irlanda, v.22, p. 239–247, 2014.

MILLION, M. *et al.* Comparative meta-analysis of the effect of Lactobacillus species on weight gain in humans and animals. **Microb Pathog**, Marselha, v.53, n.2, p. 100-8, 2012.

MILLION, M. *et al.* Gut bacterial microbiota and obesity. **Clin Microbiol Infect**, Marselha, v.19, n.4, p. 305-13, 2013.

MILLION, M. *et al.* Obesity-associated gut microbiota is enriched in Lactobacillus reuteri and depleted in Bifidobacterium animalis and Methanobrevibacter smithii. **Int J Obes**, Londres, v.36, n.6, p. 817-25, 2012.

MOREIRA, A. P.B. *et al.* Gut microbiota and the development of obesity. **Nutr Hosp**, Minas Gerais, v.27, n.5, p. 1408-14, 2012.

MURPHY, E. F. *et al.* Antimicrobials: Strategies for targeting obesity and metabolic health? **Gut Microbes**, Pittsburgh, v. 4, n. 1, p. 48-53, 2013.

MUSSO, G, *et al.* Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. **Annu Rev Med**, Turin, v. 62, p. 361-80, 2011.

NEWNHAM, J. P. *et al.* Early life origins of obesity. **Obstet Gynecol Clin North Am**, Australia, v.36,n.2,p. 227-44, 2009.

NOVAK, F. R. *et al.* Coloostro humano: fonte natural de probióticos. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.77, n.1, p. 265-270, 2001.

PALONE, M. R. T. *et al.* Fatores modificadores da microbiota gastrointestinal e sua relação com malformações craniofaciais. **Rev. Fac. Méd. Sorocaba**, Bauru, v.16, n.2, p. 107-108, 2014.

PIRZADA, O. M. *et al.* Improved lung function and body mass index associated with long-term use of Macrolide antibiotics. **J Cyst Fibros**, Sheffield, v. 2, n. 2, p. 69-71, 2003.

RILEY, L. W., *et al.* Obesity in the United States - dysbiosis from exposure to low-dose antibiotics? **Front Public Health**, Berkeley, v.1, p. 69, dez. 2013.

ROBERFROID, M. *et al.* Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **Br J Nutr.** Brussels, v.104, n. 2, p.1-63, 2010.

SHAN L.S., HOU P, WANG ZJ, *et al.* Prevention and treatment of diarrhoea with *Saccharomyces boulardii* in children with acute lower respiratory tract infections. **Benef Microbes**, v. 4, p.329-34, 2013.

SHEN, J. *et al.* The gut microbiota, obesity and insulin resistance. **Molecular Aspects of Medicine**, Shangai, v.34, p.39–58, 2013.

SZAJEWSKA H, MRUKOWICZ J. Meta-analysis: non-pathogenic yeast *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea. **Aliment Pharmacol Ther**, v.22, p.365-72, 2005.

THUNY, F. *et al.* Vancomycin treatment of infective endocarditis is linked with recently acquired obesity. **PLoS One**, Marselha, v.5, n.2, 2010.

TRASANDE, L. *et al.* Infant antibiotic exposures and early-life body mass. **Int J Obes**, New York, v.37, n.1, p. 16-23, 2013.

TURNBAUGH, P.J. *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, Saint Louis, v. 444, p.21-28, 2006.

TURNBAUGH, P. J. *et al.* Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. **Cell Host Microbe**, Goteborg, v.3, n.4, p. 213-23, 2008.

VAEL, C. *et al.* Intestinal microflora and body mass index during the first three years of life: an observational study. **Gut Pathog**, Antwerp, v.3, n.1, p. 8, 2011.

VRESE, M.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, Kiel, v. 111, p.1-66, 2008.

WALSH, C.J. *et al.* Beneficial modulation of the gut microbiota. **FEBS Letters**., Amsterdam, marc. 2014.

XU, V. *et al.* Gut microbiota, host health, and polysaccharides. **Biotechnology Advances**, Guangzhou, China, v.31, p. 318–337, 2013.

YIN, Y. N. *et al.* Effects of four bifidobacteria on obesity in high-fat diet induced rats. **World J Gastroenterol**, China, v.16, n.27, p. 3394-401, 2010.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética**UNIVERSIDADE DE SOROCABA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA-UNISO****PARECER**

Protocolo nº 010/2013
Interessados: Jorge José Marciano e Alessandra C. Marciano Tardelli Ferreira
Orientador: Fernando de Sá Del Fiol
Título do Projeto: Interferência do consumo de antibióticos e repositores de microbiota no peso e na composição corporal de ratos
Título da Experimento: Interferência do consumo de antibióticos e repositores de microbiota no peso e na composição corporal de ratos

Apresentado a Comissão de ética no uso de animais (CEUA) para análise, segundo a Lei No. 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, foi considerado:

APROVADO.

APROVADO com RECOMENDAÇÃO, devendo o proponente encaminhar as modificações sugeridas em anexo para complementação do protocolo;

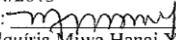
COM PENDÊNCIA, devendo o proponente readequar os itens do protocolo;

REPROVADO

Manifestação do Parecerista:

--

Data: 24/04/2013

Assinatura: 
Nome: Valquíria Miwa Hanai Yoshida
Coordenadora da CEUA-UNISO

* Encaminhar cópia deste parecer para o e-mail ceua@uniso.br e original assinado para a Seção Técnica Acadêmica

ANEXO B – Carta de submissão do artigo a revista - Chemotherapy

Chemotherapy Submission Received

che@karger.com

seg 11/08/2014 15:16

Para:

...

Dear Prof. Dr. Fernando Del Fiol:

Thank you for submitting your manuscript entitled "Obesity and the use of antibiotics and probiotics in rats" to "Chemotherapy"; the submission number is: 3542. Your submission will now be checked by the editorial office, and you will receive a confirmation mail from the editorial office soon. This step will also activate your personal user-id and password, enabling you to login to the system to check the status of your manuscript.

If you have any queries please send an email to: che@karger.com.

With kind regards,

Editorial Office