

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

Fernando Siqueira Olimpio

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E ALTERAÇÕES DE PESO DE
ANIMAIS EXPOSTOS À TETRACICLINA E AO *Lactobacillus gasseri***

**Sorocaba/SP
2016**

Fernando Siqueira Olimpio

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E ALTERAÇÕES DE PESO DE ANIMAIS
EXPOSTOS À TETRACICLINA E AO *Lactobacillus gasseri***

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
2016

Ficha Catalográfica

Olimpio, Fernando Siqueira

O39a Avaliação da microbiota intestinal e alterações de peso de animais expostos a tetraciclina e ao *Lactobacillus gasseri* / Fernando Siqueira Olimpio. – 2016.

54 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Sá Del Fiol

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –

Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2016.

Fernando Siqueira Olimpio

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E ALTERAÇÕES DE PESO DE ANIMAIS
EXPOSTOS À TETRACICLINA E AO *Lactobacillus gasseri***

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.

Aprovada em ____/____/____

Banca Examinadora

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

1º Exam: Prof. Dr. Cristiane Cassia Bergamaschi Motta
Universidade de Sorocaba

2º Exam: Prof. Dr. Maria Aparecida Lopes da Costa
Universidade de Sorocaba

Dedico este trabalho à minha querida esposa Luciene Paulino Olimpio, ao meu querido filho Lucas Paulino Olimpio, por toda a paciência e compreensão dispensadas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por proporcionar condições de realização deste trabalho.

A Universidade de Sorocaba, por tornar este sonho em realidade.

A minha família em especial à minha esposa, sempre presente nas horas mais difíceis, incentivando-me e apoiando-me sempre.

A meu amigo e companheiro Leo Victorino, pelos conselhos e auxílios técnicos.

Aos amigos Gustavo Alexandre dos Santos e Thaisa Borim Pickler, por todo apoio na fase experimental do projeto.

A minha amiga Sheila Ferreira dos Santos, por todo apoio na aquisição dos materiais necessários à pesquisa.

Aos graduandos e iniciadores científicos, Guilherme Augusto Sanches Roque, Karina Sene Rosa e Cintia Villalta, pois sem o valiosíssimo trabalho de vocês este projeto não seria possível.

Aos professores Dr. Fernando de Sá Del Fiol e Dra. Renata Lima, por toda orientação, paciência e dedicação na condução e finalização deste trabalho.

O homem de bom senso não deixa de refletir, não faz nada sem refletir. Não ande por caminhos acidentados, e você não tropeçarás nas pedras, todavia não confie no caminho que não tem obstáculos... em tudo que fizeres, acredite em si mesmo, quem confia no senhor não ficará frustrado.

(Eclesiástico, 32, 17-25)

RESUMO

A obesidade é atualmente um dos maiores problemas de saúde pública existente, estudos atuais sugerem que alterações na microbiota intestinal podem causar desordens na microbiota (disbiose) que conseqüentemente levam à obesidade. A microbiota intestinal é influenciada e alterada diretamente por meio do uso de prebióticos, probióticos e antibióticos, pois alteram a quantidade e as espécies bacterianas. Atualmente, sabe-se que a microbiota intestinal estável e normal, é formada majoritariamente pelos filos Firmicutes e Bacteroidetes. Alterações causadas principalmente por antibióticos podem interferir diretamente na proporção destes filos, alterando o balanço energético do hospedeiro. O presente estudo avaliou possíveis interferências na microbiota intestinal causadas pela administração de tetraciclina e pela ação do *Lactobacillus gasseri*, em 72 ratos de duas gerações. Cada geração foi dividida em três grupos experimentais, sendo: tetraciclina (n=12), tetraciclina e *L.gasseri* (n=12) e controle (n=12), a segunda geração foi formada pela prole resultante da primeira geração. Os tratamentos foram realizados, em 4 doses, durante 10 dias. Foram conduzidas análises antropométricas, e análise molecular com qPCR, em amostras de fezes, para investigação e quantificação relativa dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, antes e depois do tratamento. Os resultados mostraram aumento de peso e de BMI (body mass Index) nos animais tratados exclusivamente com a tetraciclina. O uso do probiótico associado ao antibiótico protegeu os animais do efeito pró-obesidade dos antibióticos. A análise molecular apontou, nos animais tratados com a tetraciclina, uma desproporção entre Firmicutes e Bacteroidetes, sendo a provável causa do aumento de peso e de BMI. O uso de probiótico associado ao tratamento com antibióticos pode proteger, especialmente crianças, do efeito pró-obesidade que ocorre com o uso de antibióticos.

Palavras-chave: Antibiótico. Obesidade, Microbiota. Probióticos.

ABSTRACT

Obesity is currently one of the largest public health problems, and current studies suggest that changes in the intestinal microbiota can cause disorders of the microbiota (dysbiosis), which eventually lead to obesity. The gut microbiota is directly influenced by the use of prebiotics, probiotics and antibiotics because these treatments alter the quantities of bacterial species. It is currently known that the intestinal microbiota is stable and typically composed primarily of the phyla Firmicutes and Bacteroidetes. Changes caused by antibiotics can interfere directly with the proportions of these phyla, affecting the energy balance of the host. This study evaluated possible interference with the gut microbiota caused by the administration of tetracycline and *Lactobacillus gasseri* in 72 rats from two generations. Each generation was divided into three experimental groups: tetracycline (n = 12), tetracycline and *L. gasseri* (n = 12) and control (n = 12). The second generation was composed of the progeny of the first generation. The treatments were performed in 4 doses over 10 days. Anthropometric analyses were conducted using molecular analysis and qPCR in stool samples to investigate the relative quantities of the phyla Firmicutes and Bacteroidetes before and after treatment. The results showed that an increase in weight and body mass index (BMI) occurred in animals treated with tetracycline alone. The use of the probiotic in combination with the antibiotic protected the animals from the pro-obesity effect of the antibiotic. Molecular analysis showed that in animals treated with tetracycline, a change in the proportions of Firmicutes and Bacteroidetes bacteria occurred, which was likely the cause of the increased weight and BMI. The use of a probiotic in combination with an antibiotic treatment can protect against the pro-obesity effect of antibiotic use, especially in children.

Keywords: Obesity. Antibiotics. Probiotics. Gut microbiota.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Gaiolas de acondicionamento dos animais - biotério da Universidade de Sorocaba.....	22
Figura 2 - <i>Lactobacillus gasseri</i> , em meio líquido.....	23
Figura 3 - <i>Lactobacillus gasseri</i> , identificação microscópica, técnica de coloração de Gram	24
Figura 4 - <i>Lactobacillus gasseri</i> , dissolvido em solução salina.....	24
Figura 5 - Coleta de fezes individual.....	25
Figure 1 - Weight gain (g) and standard deviation of the groups in stage 1	37
Figure 2 - Weight gain (g) and standard deviation of the groups in stage 2.	37
Figure 3 - Firmicutes:Bacteroidetes ratios (%) in the animals' feces at the beginning and end of stage 1.....	38
Tabela 1 - Protocolo de tratamento por grupo experimental	27
Tabela 2 - Primeira fase, dias de vida e procedimentos realizados	27
Tabela 3 - Segunda fase, dias de vida e procedimentos realizados	28
Tabela 4 - Primers que serão utilizados para a quantificação de genes específicos no qPCR.....	30
Table 1 - Days of life and procedures performed	35
Table 2 - BMIs of the animals at the end of stages 1 and 2.	38

LISTA DE ABREVIATURAS

AL -	Solução tamponante utilizado na preparação da amostra de fezes, kit de extração
ASL -	Solução tamponante utilizado na preparação da amostra de fezes, kit de extração
ATCC -	American Type Culture Collection
AW1 -	Solução tamponante utilizado na preparação da amostra de fezes, kit de extração
AW2 -	Solução tamponante utilizado na preparação da amostra de fezes, kit de extração
BSA -	Bovine Serum Albumin
CCT -	Coleção de Culturas Tropical
CEUA -	Comissão De Ética No Uso de Animais (Uniso)
CONCEA -	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DNA -	Ácido Desoxirribonucléico
FAT -	Fundação André Tosello
IMC -	Índice de Massa Corporal
LPL -	Enzima Lipase Lipoprotéica
MRS -	De Man, Rogosa e Sharpe – são os autores da técnica de crescimento para <i>Lactobacillus</i>
OMS -	Organização Mundial da Saúde
PCR -	Polymerase Chain Reaction
QPCR -	Polymerase Chain Reaction Quantitative
UFC -	Unidades Formadoras de Colônia
WHO -	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	Microbiota Intestinal.....	13
2.2	Obesidade	16
2.3	Interferência dos Antibióticos na Microbiota Intestinal	17
2.4	Tetraciclinas.....	18
3	OBJETIVOS	19
3.1	Objetivo Geral	19
3.2	Objetivos Específicos	19
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1	Material.....	20
4.2	Equipamentos.....	20
4.3	Preparação do Material	21
4.3.1	Tamanho Amostral	21
4.3.2	Animais	21
4.3.3	Tetraciclina.....	22
4.3.4	<i>Lactobacillus gasseri</i>	22
4.3.5	Preparação das Amostras de Fezes e Extração do DNA.....	24
4.4	Delineamento Experimental.....	26
4.4.1	Primeira Fase	27
4.4.2	Segunda Fase.....	28
4.4.3	Avaliação de Ganho de Peso e Massa Corpórea	28
4.4.4	Análise estatística da Avaliação de Peso e Massa Corpórea.	29
4.4.5	Quantificação Relativa do DNA.....	29
5	RESULTADOS.....	31
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
	REFERÊNCIAS.....	45
	APÊNDICE A – COMITÊ DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS	52
	ANEXO A – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO	54

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a obesidade tornou-se um grande desafio para a saúde pública e está sendo tratada como verdadeira pandemia, particularmente nos países ocidentais (MURPHY et al., 2013).

A obesidade possui etiologia multifatorial e está ligada a cada indivíduo, herança genética, a falta de atividade física, dos hábitos comportamentais e culturais da vida moderna, como dietas ricas em gordura e a substituição gradual do ser humano por atividades mecanizadas são os principais fatores associados ao aparecimento da obesidade (RILEY; RAPHAEL; FAERSTEIN, 2013).

A obesidade pode afetar quase todos os sistemas e órgãos e causa graves consequências, incluindo hipertensão, dislipidemia, resistência à insulina, esteatose, e como consequência, complicações psicossociais (HAN; LAWLOR; KIM, 2010).

Sabe-se que a composição e, principalmente, a atividade metabólica da microbiota intestinal interferem no desenvolvimento corporal do hospedeiro, e que alterações na microbiota intestinal podem aumentar o risco de obesidade (MURPHY et al., 2013).

O trato intestinal humano abriga uma diversificada e complexa comunidade microbiana, chamada microbiota intestinal, que desempenha papel central na saúde humana. O intestino é colonizado por mais de 400 espécies de bactérias, que representam cerca de 100 vezes a quantidade de genes comparados ao genoma humano (CAITRIONA; COTTER, 2013).

Evidências, principalmente a partir de investigações em modelos animais, sugerem que a microbiota intestinal afeta a aquisição de nutrientes e a regulação energética do hospedeiro (ZANG et al., 2009). Sua composição é influenciada diretamente com o uso, por parte do hospedeiro, de prebióticos, probióticos e antibióticos, pois alteram a quantidade e as espécies bacterianas. As modificações causadas principalmente por antibióticos, podem interferir diretamente no metabolismo corporal e no balanço energético do hospedeiro, fenômeno denominado disbiose (MILLION; LAGIER; PAULZ, 2013).

As alterações na microbiota intestinal induzidas por antibiótico ministrado às crianças na primeira infância podem ser responsáveis pelo aparecimento da obesidade na vida infantil e adulta (BIBILONI; PONS; TUR, 2013).

Segundo Libby e Schaible, (1955), desde os anos 40, há relatos de utilização de antibióticos em doses baixas adicionados à ração animal, a fim de aumentar o ganho de peso. Este efeito aumenta a eficiência da alimentação de aves, porcos e gado bovino. Para Lin e colaboradores (2013), e Trasande e colaboradores (2013), este efeito é melhor evidenciado quando o antibiótico é administrado durante os primeiros dias de vida do animal.

Estudos, como os de Collier, (2003), Membrez, (2008), Rettedal, (2009), Kim, (2010), Looft, (2010), Robinson, (2010), e Torok, (2011), têm relacionado o uso de antibióticos à alterações na microbiota intestinal, sendo que o surgimento destas alterações pode ser uma possível explicação para a ocorrência de uma epidemia mundial de obesidade.

Os estudos que mostraram que tratamentos prolongados com antibióticos durante a primeira infância podem levar à consequências metabólicas duradouras, entre elas a obesidade, levaram à inúmeras pesquisas pelo mundo buscando conhecer melhor a relação: microbiota-antibióticos-obesidade. Esta é a proposta do presente trabalho.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Microbiota Intestinal

O termo microbiota intestinal refere-se ao ecossistema essencialmente bacteriano que reside normalmente nos intestinos do homem (BARBOSA et al., 2010).

Desde a descoberta de bactérias na placenta em partos cesarianos por Harris e Brown em 1927, tem sido contestada a crença de que o feto se desenvolve em um ambiente estéril. Recentemente graças as metodologias moleculares avançadas, já se sabe que numerosos organismos microbianos colonizam o ambiente uterino (PAYNE, 2014). Payne, (2014) e Solt (2015) contribuíram para a caracterização da microbiota uterina, especificamente aquele presente no líquido amniótico, membranas fetais, e da placenta.

Métodos independentes de cultivo permitiram a caracterização da microbiota do trato reprodutivo de mulheres grávidas e não grávidas, aumentando a compreensão do papel da microbiota uterina e a possível transmissão para o bebê. A passagem através do trato vaginal é reconhecida como a principal forma de transmissão da microbiota materna para o recém-nascido (SOLT, 2015).

Na primeira infância, que compreende os primeiros três anos de vida, a microbiota intestinal é muito susceptível a alterações, porém há uma estabilização após esta fase, podendo haver modificações em situações específicas ao longo da vida (PENDERS et al., 2006; KALLIOMÄKI et al., 2008).

A estabilidade adquirida em idade adulta pode ser afetada por fatores como: idade, sexo, localização geografia do indivíduo, dieta e exposição precoce a antibióticos, entre outros. (AGANS et al., 2011; VAEL et al., 2011; MARKLE et al., 2013; GRZESKOWIAK et al., 2012). Indivíduos adultos podem ter variações na proporção das bactérias em consequência de alterações ambientais ou de estados patológicos (RILEY et al., 2013; ARUMUGAM et al., 2011; WU et al., 2011).

Anatomicamente, a microbiota intestinal constitui um importante "órgão" externo dentro do ecossistema gastrointestinal, que compreende mais de 400 espécies diferentes de bactérias (HAO; LEE, 2004; QIN et al., 2010).

O hospedeiro humano fornece um ambiente rico em nutrientes e a microbiota oferece funções indispensáveis que os seres humanos não podem exercer, tais

como a produção de algumas vitaminas, a digestão de polissacarídeos complexos e a formação de um ambiente imunológico (LEPAGE et al., 2013).

A microbiota intestinal hidrolisa polissacarídeos não digeríveis para monossacarídeos facilmente absorvíveis e ativa a lipase lipoprotéica (LPL) enzima responsável pela hidrólise de moléculas de triglicérides encontradas em partículas de lipoproteínas, por ação direta sobre o epitélio das vilosidades (KALLIOMÄKI, 2008).

As bactérias comensais influenciam o desenvolvimento normal e a função do sistema imunológico da mucosa intestinal, induz a produção de IgA criando uma barreira epitelial, com a produção de ácidos graxos de cadeia curta, principalmente, acetato, propionato e butirato. Bactérias residentes influenciam positivamente a proliferação de células epiteliais intestinais e sua diferenciação (MACFARLANE, 2011).

Notavelmente, estas bactérias intestinais contribuem com cerca de 1,5 kg do peso do corpo humano, Toivanen e colaboradores (2001) compararam a microbiota ao peso dos principais órgãos humanos, tais como o fígado (aproximadamente 1,5 kg) e cérebro (cerca de 1,4 kg), excedendo o pulmão (aproximadamente 0,84 kg), o rim (aproximadamente 0,27 kg) e do baço (cerca de 0,14 kg).

As bactérias da microbiota intestinal são encontradas nos intestinos delgado e grosso, sendo o último o mais densamente colonizado. A concentração de bactérias no intestino delgado proximal é em torno de 10^4 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), sendo as espécies mais representativas as de **estafilococos**, **estreptococos** e **lactobacilos**. Raramente são encontradas bactérias anaeróbias. Já no íleo distal, o número de bactérias é de 10^8 UFC/mL, e a microbiota torna-se bastante diversificada, uma vez que passa a abranger coliformes e várias espécies de bactérias anaeróbias como **bacterioidetes**, **fusobacterium** e **clostridium** (TANNOCK, 1995).

Depois da válvula ileocecal, a concentração bacteriana aumenta bruscamente, atingindo 10^{10} - 10^{11} UFC/mL, do conteúdo intestinal. No intestino grosso as bactérias anaeróbias superam as demais (facultativas e aeróbias) por um fator de 10^1 - 10^3 . Predominam os **Bacteroides**, **Bifidobacterium** e **Fusobacterium**. Os **Lactobacillus**, **Streptococcus**, **Clostridium** e **Enterobacter** são também bastante freqüentes (TANNOCK, 1995). Após a primeira infância,

quando ocorre a estabilização, o ecossistema é dominado pelos filos **Bacteroidetes** e **Firmicutes** (ANGELAKIS et al., 2012).

Quando observa-se a microbiota intestinal em um grupo relativamente grande de indivíduos constata-se que a relação entre os filos **Firmicutes** e **Bacteroidetes** não é a mesma entre todos. Considerando-se esta relação, verificou-se que a depleção de um filo, por exemplo, do filo **Firmicutes**, tem sido associada com problemas inflamatórios intestinais (SOKOL et al., 2009).

Milion e colaboradores (2013), utilizando ratos, evidenciaram maior número do filo **Firmicutes** encontrados nos ratos obesos, ao mesmo tempo que observou-se diminuição do filo **Bacteroidetes**. Balamurugan e colaboradores (2010) encontraram em humanos níveis de *Faecalibacterium prausnitzii* do filo **Firmicutes** em quantidades significativamente maiores em crianças obesas comparados crianças não obesas.

Na maioria dos indivíduos, cerca de 90% dos filos são **Firmicutes** e **Bacteroidetes**, sendo o restante composto por **Actinobacterias** (família **Bifidobacteriaceae**) e **Proteobacterias** (família **Enterobacteriaceae**). Em seguida, na ordem de frequência, aparecem os filos **Synergistetes**, **Verrucomicrobia**, **Fusobacteria** e **Euryarchaeota**, representando percentual pequeno da microbiota humana. As principais integrantes dos **Firmicutes** são as classes **Bacilli**, **Clostridia** e **Molicutes** e dos **Bacteroidetes** são as **Bacteroides**, **Flavobacteria** e **Sphingobacterias** (ARUMUGAM et al., 2011; QIN et al., 2010, HUTTENHOWER et al., 2012; DE FILIPPO et al., 2010).

Pode se considerar que os seres humanos possuem dois sistemas biológicos complexos, sendo o genoma humano, herdado geneticamente e ambientalmente, e o genoma microbiano (microbiota) adquirido. Considera-se que a população microbiana seja 10 vezes superior ao número de células humanas, de forma que não se pode subestimar a influencia extra genômica destes microrganismos (YIP, CHAN; 2015).

2.2 Obesidade

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal no indivíduo. Para o diagnóstico em adultos, o parâmetro utilizado mais comumente é o do índice de massa corporal (IMC). O IMC é calculado dividindo-se o peso do paciente pela sua altura elevada ao quadrado. É o padrão utilizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que identifica o peso normal quando o resultado do cálculo do IMC está entre 18,5 e 24,9. Para ser considerado obeso, o IMC deve estar acima de 30 (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA, 2015).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, a obesidade em todo o mundo mais do que duplicou desde 1980. Em 2014, mais de 1,9 bilhão de adultos, com 18 anos ou mais velhos, estavam acima do peso, destes mais de 600 milhões eram obesos, 42 milhões de crianças menores de 5 anos apresentaram sobrepeso ou obesidade em 2013. A maioria da população do mundo vive em países onde o sobrepeso e a obesidade matam mais pessoas que o baixo peso (WHO, 2015).

Uma vez considerado como problema de países de rendimento elevado, o excesso de peso e a obesidade estão agora em ascensão em países de baixa e média renda, especialmente em ambientes urbanos. Nos países em desenvolvimento com economias emergentes (classificados pelo Banco Mundial) a taxa de aumento de sobrepeso e obesidade na infância tem sido mais de 30% superior ao de países desenvolvidos (WHO, 2015).

A obesidade é vista como um dos importantes problemas de saúde pública em todo o mundo, e a velocidade de propagação é maior em crianças. Crianças obesas muitas vezes se tornam adultos obesos (OWEN, 2005).

Na adolescência, a obesidade está cada vez mais frequente, causando efeitos adversos à saúde. A massa corporal excessiva, inclusive sobrepeso e obesidade, juntamente com a hipertensão, representam grande perigo à civilização do século 21 (ITAGI, 2011). A obesidade está associada com graves consequências para a saúde, incluindo diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e uma variedade de cânceres, entre outros, e repetidamente vem demonstrando estar associada a um maior risco de mortalidade (MURPHY et al., 2013).

Um estudo de coorte realizado na Dinamarca (AJSLEV et al., 2014) com mais de 28.000 participantes sendo mães e filhos, demonstrou um risco aumentado de excesso de peso nas crianças que se submeteram à tratamento com antibiótico, principalmente quando o tratamento ocorreu durante os primeiros 6 meses de vida. Estes dados foram confrontados com o famoso estudo ALSPAC (Avon Longitudinal Study of Parents and Children) da Universidade de Bristol em que crianças com mães de peso normal que foram submetidas a um ou mais tratamento com antibiótico verificou-se que houve correlação entre o uso de antibióticos e o sobrepeso infantil (COX, 2014).

2.3 Interferência dos Antibióticos na Microbiota Intestinal

Os antibióticos são prescritos em larga escala em todo o mundo, sendo o uso mais frequente em crianças, por vezes, com emprego abusivo e inapropriado. Há uma importante preocupação sobre o uso excessivo dos antibióticos e suas consequências, sendo a principal delas a resistência bacteriana (CHO et al., 2012).

Além disso, o uso abusivo de antibióticos também traz como consequência alterações na microbiota intestinal, que se torna pior quando ocorre na primeira infância, pois as crianças são mais vulneráveis e suscetíveis às mudanças comparado aos adultos (MARQUES et al., 2014; MOREIRA et al., 2012).

O impacto do uso dos antibióticos sobre a composição da microbiota intestinal dependerá da concentração do fármaco no 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 intestinal. O retorno ao estado normal da microbiota gastrointestinal ocorre somente trinta dias após o término do tratamento com antimicrobianos (PALONE et al., 2014).

A alteração na composição da microbiota originada pelo uso de antibióticos pode levar a alterações metabólicas e aumento de peso. O mecanismo pelo qual os agentes antibacterianos afetam o desempenho em relação ao ganho de peso ainda não está bem definido, mas várias hipóteses têm sido propostas: (I) nutrientes são eficientemente melhor absorvidos por causa do estreitamento 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).

2.4 Tetraciclina

As tetraciclina surgiram ao final dos anos quarenta, quando havia uma verdadeira corrida por antibióticos novos e potentes; as primeiras tetraciclina foram obtidas a partir de microrganismos (*Streptomyces*) presente em amostras de solo coletadas em diferentes partes do mundo. Em 1948, aparece o primeiro composto, a clortetraciclina, e dois anos mais tarde surge a oxitetraciclina. A partir daquele momento, com resultado dos avanços no campo da bioquímica, as novas tetraciclina passam a ser sintetizadas e surgem na seguinte ordem: tetraciclina, em 1952; demeclocycline, em 1957; metaciclina, em 1961; doxiciclina, em 1966; minociclina, em 1972; limeciclina, em 1976 (RODRÍGUEZ, 1998).

A tetraciclina é um inibidor de síntese protéica, com amplo espectro de atividade, atuando sobre aeróbios, anaeróbios, Gram positivos, Gram negativos, *Rickettsias*, *Micoplasmas* e em atípicos; porém, uma vez que, apresenta pequena absorção oral e em virtude de seu amplo espectro de atividade, é um antibiótico com imenso potencial de inversão de microbiota e, conseqüentemente, o aparecimento da disbiose (GILBERT, 2013).

Os antimicrobianos são uma importante arma contra doenças bacterianas em animais e humanos. No entanto, depois que uma nova droga é introduzida no organismo animal ou humano para tratamento de uma infecção bacteriana, bactérias geralmente desenvolvem resistências, muitos patógenos são resistentes a antibióticos (HELLWEGER et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho propõe-se a estudar a influência do tratamento com o antibiótico tetraciclina, e a possível interferência da associação de um probiótico, na microbiota intestinal de duas gerações de ratos.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a microbiota intestinal de animais expostos a diferentes tratamentos, por meio de ensaios moleculares utilizando qPCR real time
- b) Avaliar a massa corpórea de animais expostos a diferentes tratamentos, por meio de aferições e análises antropométricas
- c) Avaliar o uso do probiótico, como possível protetor da microbiota intestinal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

36 Ratos wistar, adquiridos do biotério Anilab CNPJ: 65.440.612/0001-40, biotério devidamente credenciado no CIAEP/CONCEA N° 01.0264.2014;

36 Ratos wistar, criados no biotério da Universidade de Sorocaba;

1 (cepa) - *Lactobacillus gasseri* - N° CCT – 3748 , ATCC 33323;

Tetraciclina 500 mg;

Amostras de fezes frescas;

2 kits – QIAmp DNA Stool mini kit (50) – lote n° 151027784;

SYBR Green PCR mastermix

Agulhas para gavagem;

Thiopentax ®

Etanol

4.2 Equipamentos

Estantes ventiladas para gaiolas de ratos e camundongos;

Gaiolas para ratos e camundongo;

Balança de precisão;

Autoclave;

Jarra de anaerobiose;

Fita métrica não extensível;

StepOnePlus™ Real-Time PCR System;

Microcentrifuga;

Banho-maria (70°C);

Pipetas graduadas, de 01ml, 05 ml;

Pipetas automáticas;

Fluxo Laminar;

Agitador Vortex;

Vidrarias em geral.

4.3 Preparação do Material

4.3.1 Tamanho Amostral

Para determinação do tamanho amostral, representado por uma variável quantitativa, utilizou-se o desvio padrão populacional da variável (peso), com um nível de significância (95% = 1,96), além de um erro amostral (5g) máximo tolerado (FONTELLES et al., 2010).

Para a determinação do desvio padrão populacional, empregou-se a seguinte equação:

$$n = ([Z \alpha/2 \times d]/E)^2$$

Onde:

n = tamanho amostral

Z $\alpha/2$ = nível de significância (95% ou 1,96)

d = desvio padrão populacional da variável (8,72g), Del Fiol, (2014)

E = Erro padrão tolerado (5g)

Temos: $((1,96 \times 8,72)/ 5)^2 = (3,41)^2 = 11,63$ (**12 animais por grupo**).

4.3.2 Animais

Os animais foram recebidos na unidade II, dos laboratórios de Toxicologia da Universidade de Sorocaba onde situa-se o biotério, foram adaptados às condições experimentais, de acordo com as Normas Brasileiras de experimentação Animal. Os animais foram alojados em gaiolas devidamente preparada e limpas periodicamente, conforme observa-se na figura 01. O biotério possuía controle de iluminação, que foi ajustado para um ciclo claro/escuro de 12 horas alternados, os animais tiveram livre acesso a comida e água, durante toda a permanência. A temperatura ambiente foi mantida a 22 C°.

Figura 1 - Gaiolas de acondicionamento dos animais - biotério da Universidade de Sorocaba



Elaboração própria

4.3.3 Tetraciclina

Foram adquiridas cápsulas de 500 mg de tetraciclina, comercialmente vendidos em farmácias e drogarias. As cápsulas eram abertas e seu conteúdo suspenso em 10 mL de solução salina (NaCl a 0,9%), apenas no momento da administração. A suspensão foi manualmente agitada vigorosamente, para garantir a homogeneidade, uma vez que a tetraciclina não se solubiliza facilmente em água.

4.3.4 *Lactobacillus gasseri*

A cepa do *Lactobacillus gasseri*, foi adquirida, da Fundação André Tosello (FCC), CNPJ 46.126.322/0001-82, departamento de coleção de Culturas Tropicais. Os processos de preservação e manutenção das linhagens de microrganismos e sua distribuição obedeceram às regras ditadas pela WFCC (World Federation of Culture Collections), e se baseiam nas metodologias descritas por Muro e Luchi (1989); Kirsop e Doyle (1991); Hunter e Belt (1996); WFCC (World Federation for Culture Collections), 2010.

A linhagem utilizada foi recebida em duplicata em tubos *slants* na forma reativada pela FCC, após receber a cepa a mesma foi acondicionada em geladeira no laboratório de Controle Microbiológico, situado no prédio de Apoio II, da Universidade de Sorocaba. A replicação da cepa para administração aos animais se deu pelo seguinte método:

Crescimento em meio de cultura líquido:

O meio de cultura líquido para o crescimento do *Lactobacillus gasseri*, foi preparado com um caldo de AGAR MRS *Lactobacillus*®, meio de cultura seletivo

para *Lactobacillus* em geral, a preparação do meio de cultura seguiu a técnica difundida por De Man et al., 1960, e foi esterilizada por autoclave à 121 °C.

A cepa de *Lactobacillus gasseri*, foi Inoculada no meio líquido, dentro da câmara de fluxo laminar, após a inoculação os tubos foram acondicionados em jarra de anaerobiose por 48 horas, após este tempo, foi positivo o crescimento do *Lactobacillus gasseri*, conforme a figura 2.

Figura 2 - *Lactobacillus gasseri*, em meio líquido



Elaboração própria

Crescimento em meio de cultura sólida:

O meio de cultura sólida para o crescimento do *Lactobacillus gasseri*, foi preparado com AGAR MRS *Lactobacillus*®, para meio de cultura sólido conforme descrito por De Man et al., 1960, e foi esterilizado por autoclave à 121°C, depois foi reservado ainda na forma líquida em função da alta temperatura. Em placa de Petri, foi adicionado 1 ml da amostra do meio líquido (figura 2), contendo o *Lactobacillus gasseri* e logo em seguida vertido 5 ml do reservado de AGAR MRS *Lactobacillus*®, para meio sólido ainda na forma líquida, com a temperatura por volta dos 60°C, enquanto ocorria o resfriamento do meio sólido, promoveu-se uma agitação vagarosa até a total solidificação do mesmo, desta forma, o *Lactobacillus gasseri*, foi fundido ao meio sólido, esta técnica favorece o crescimento do *Lactobacillus gasseri* abaixo da camada gelatinosa do meio AGAR MRS *Lactobacillus*®, as placas também foram acondicionada em jarra de anaerobiose e esta foi levada à estufa, onde permaneceu por mais 48 horas sob uma temperatura de 37 ° C. Após este período foi positivo, o crescimento do *Lactobacillus gasseri*.

O crescimento do *Lactobacillus gasseri*, foi confirmado por identificação microscópica, utilizando-se da técnica da coloração de Gram, conforme ilustra da figura 3.

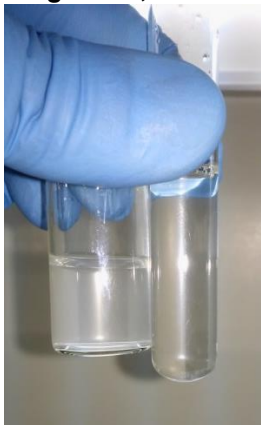
Figura 3 - *Lactobacillus gasseri*, identificação microscópica, técnica de coloração de Gram



Elaboração própria

Para a administração aos animais o *Lactobacillus gasseri* foi dissolvido em solução salina (NaCl a 0,9%) à 10^{-8} UFC/mL, seguindo a escala de Mc Farland, conforme ilustra a figura 4.

Figura 4 - *Lactobacillus gasseri*, dissolvido em solução salina.



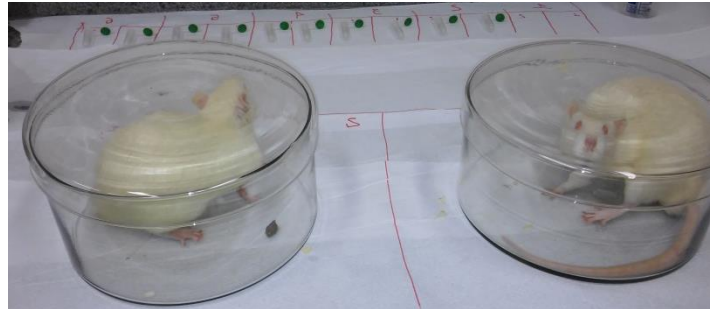
Elaboração própria

4.3.5 Preparação das Amostras de Fezes e Extração do DNA.

Foram realizadas 02 coletas de fezes por fase, sendo a primeira coleta antes do tratamento, animais com 31 dias de vida, e a segunda coleta após o tratamento, animais com 94 dias de vida, as coletas foram realizadas de forma individual para cada animal, os mesmos eram retirados da gaiola e transferidos para uma cuba de vidro devidamente desinfetada com álcool 70°, a medida que o material era

depositado no fundo da cuba de vidro, eram coletados com uma espátula e armazenado em um tubo de coleta de 2 ml, conforme ilustrado pela figura 5. A cuba era novamente desinfetada para receber outro animal, as amostras de fezes eram estocadas à -80° C.

Figura 5 - Coleta de fezes individual.



Elaboração própria

Para preparação das amostras foi pesado entre 180-220 mg de fezes do “pool” de cada grupo e colocadas em tubos de microcentrifuga de 2mL, os tubos ficaram sob refrigeração. A cada tubo foi adicionado 1,4 ml de tampão ASL, fornecido com o kit de extração, e agitado no Vortex continuamente por 1 minuto ou até que a amostra estivesse completamente homogeneizada, logo após foi aquecido por 5 minutos à 70°C e novamente agitado no Vortex, por 15 segundos. As amostras foram centrifugadas à 14.000 rpm, por 01 minuto, após a centrifugação foi pipetado 1,2 ml do sobrenadante e descartado o pellet (material sólido decantando). Adicionou-se o comprimido de InhibiteX, fornecido com o kit de extração, a cada amostra e logo em seguida foi agitado em Vortex por 01 minuto ou até que o comprimido estivesse totalmente suspenso, levou-se à incubadora por 01 minuto à temperatura ambiente, centrifugou-se as amostras novamente por 03 minutos à 14.000 rpm, pipetou todo o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 ml e descartou-se o pallet, centrifugou-se novamente por 03 minutos à 14.000 rpm. A um novo tubo de 1,5 ml adicionou-se 15µL de Proteinase K, fornecida com o kit de extração, e 200 µL do sobrenadante anterior, adicionou-se 200 µL do tampão AL, fornecido com o kit de extração, e agitou-se em Vortex por 15 segundos, levou-se à incubadora à 70°C por 10 minutos, para a enzima promover a lise, adicionou-se 200 µL de etanol, agitando em Vortex. Utilizando-se de um tubo de coleta de 2 ml contendo uma coluna QiaAmp devidamente identificada, foi transferido cuidadosamente todo o

“lisado” anterior para a coluna, e centrifugado em velocidade máxima, até que a coluna ficasse vazia, repetiu-se este passo, transferindo a coluna para um novo tubo de coleta de 2 ml e descartando o tubo anterior com o filtrado, abriu-se cuidadosamente a coluna e foi adicionado 500 µL do tampão AW1, fornecido com o kit de extração, e centrifugado a 14.000 rpm por 01 minuto, transferiu-se a coluna para um novo tubo de coleta de 2 ml, e cuidadosamente foi adicionado 500 µL do tampão AW2, fornecido com o kit de extração, e novamente centrifugado a 14.000 rpm desta vez por 03 minutos, transferiu-se novamente a coluna para um novo tubo de coleta de 2ml e centrifugou-se por 01 minuto a 14.000 rpm, por último transferiu-se a coluna para um tubo de 1,5 ml, e foi adicionado diretamente na membrana da coluna 200 µL de tampão AE, fornecido com o kit de extração, incubou-se por 01 minuto em temperatura ambiente e centrifugou-se em velocidade máxima para obter o DNA.

4.4 Delineamento Experimental

O experimento foi dividido em duas fases experimentais, foram utilizados 36 animais em cada uma delas, a cada fase os animais foram divididos em 03 três grupos experimentais, sendo:

Grupo A = Grupo Controle, com 12 animais pertencente à este grupo

Grupo B = Grupo tetraciclina, com 12 animais pertencente à este grupo

Grupo C = Grupo tetraciclina e *Lactobacillus gasseri*, com 12 animais pertencente à este grupo.

Após o preparo da tetraciclina e do *Lactobacillus gasseri*, as doses foram ajustadas para os animais, sendo 50 mg/kg de tetraciclina suspensa em solução salina (NaCl a 0,9%) e 10^{-8} UFC/mL de *Lactobacillus gasseri*, também suspensas em solução salina (NaCl a 0,9%). O tratamento foi realizado em 4 doses, sendo administrados por via oral, por meio da técnica de gavagem, os animais receberam o tratamento entre a idade de 41 à 50 dias de vida, conforme o protocolo descrito na tabela 1.

Tabela 1 - Protocolo de tratamento dos grupo experimentais.

Grupos	Dias de vida	Tratamento
Grupo A	41	1º dose - Solução Salina (NaCl 9%)
Grupo A	44	2º dose - Solução Salina (NaCl 9%)
Grupo A	47	3º dose - Solução Salina (NaCl 9%)
Grupo A	50	4º dose - Solução Salina (NaCl 9%)
Grupo B	41	1º dose - Tetracilina 50 mg/kg
Grupo B	44	2º dose - Tetracilina 50 mg/kg
Grupo B	47	3º dose - Tetracilina 50 mg/kg
Grupo B	50	4º dose - Tetracilina 50 mg/kg
Grupo C	41	1º dose - <i>Lactobacillus gasseri</i> 10 ⁻⁸ UFC/mL e + Tetracilina 50 mg/kg
Grupo C	44	2º dose - <i>Lactobacillus gasseri</i> 10 ⁻⁸ UFC/mL e + Tetracilina 50 mg/kg
Grupo C	47	3º dose - <i>Lactobacillus gasseri</i> 10 ⁻⁸ UFC/mL e + Tetracilina 50 mg/kg
Grupo C	50	4º dose - <i>Lactobacillus gasseri</i> 10 ⁻⁸ UFC/mL e + Tetracilina 50 mg/kg

Elaboração própria

4.4.1 Primeira Fase

Os 36 animais da primeira fase, eram compostos por 18 ratos machos e 18 ratas fêmeas, que formaram casais e se dividiram entre os grupos “A”, “B” e “C”, sendo cada grupo formado por 6 casais, “N” = 12, conforme tamanho amostral, todos os animais da primeira fase, chegaram ao biotério com 21 dias de vida, e permaneceram no biotério até os 94 dias de vidas, quando encerrou-se a primeira fase. Durante este período, foram submetidos aos procedimentos descritos da tabela 2.

Tabela 2 - Procedimentos realizados, nos animais durante a primeira fase.

Dias de vida	Procedimento
21	Formação dos casais, e período de adaptação
31	1º Coleta de fezes
41	1º antropometria - 1º dia de tratamento,
44	2º dia de tratamento
47	3º dia de tratamento
50	4º dia de tratamento
57	2º antropometria
62	2º Coleta de fezes
71	Nascimento dos filhotes
94	3º coleta de fezes – 3º antropometria

Elaboração própria

4.4.2 Segunda Fase

A segunda fase, contou com os filhotes dos animais da primeira fase, foram separados 36 filhotes, sendo 12 de cada grupo experimental, para fins de controle populacional, foram utilizados apenas animais machos, que formaram duplas e se dividiram entre os grupos “A”, “B” e “C”, novamente, sendo cada grupo formado por 06 duplas, “N” = 12, conforme tamanho amostral, todos os animais da segunda fase, nasceram no biotério da Universidade de Sorocaba, em dias distintos, desta forma, para fins de comparação todos os procedimentos aos quais estes animais foram submetidos ocorreram nos mesmos dias de vida em comparação aos animais da primeira fase, conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3 - Procedimentos realizados, nos animais durante a segunda fase.

Dias de vida	Procedimento
21	Formação dos casais, e período de adaptação
31	1º Coleta de fezes
41	1º antropometria - 1º dia de tratamento,
44	2º dia de tratamento
47	3º dia de tratamento
50	4º dia de tratamento
57	2º antropometria
62	2º Coleta de fezes
71	Nascimento dos filhotes
94	3º coleta de fezes – 3º antropometria

Elaboração própria

4.4.3 Avaliação de Ganho de Peso e Massa Corpórea

Para avaliar o ganho de peso, os animais foram pesados à cada tomada de medidas antropométricas (medidas das circunferências abdominais e torácicas, peso e comprimento), que foram realizadas durante cada fase, conforme descrito nas tabelas 2 e 3, foram 03 medidas antropométricas por fase, antes do tratamento, uma semana após o tratamento, e ao final da fase.

A avaliação antropométrica dos animais, foi realizada como descrito por NOVELLI et al. (2007). As medidas antropométricas foram realizadas com fita métrica não extensível, com uma precisão de 0,1 cm. Todas as medições foram

realizadas em animais anestesiados, foi utilizado o anestésico Thipentax® 1g. Com dados da massa corporal pode-se avaliar o Índice de massa corporal (IMC): calculado dividindo-se a massa do animal pelo quadrado da sua altura (NOVELLI et al., 2007).

Para a avaliação antropométrica, foram utilizados apenas os machos, em virtude da prenhez das fêmeas interferir nessa avaliação.

4.4.4 Análise estatística da Avaliação de Peso e Massa Corpórea.

Todas as medidas foram realizadas em duplicatas. As diferenças estatisticamente significante entre os três grupos foram calculada usando a ferramenta de análise de duas vias da variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey - Kramer. A diferença entre os grupos foi considerada estatisticamente significativa quando o valor de $p < 0,05$.

4.4.5 Quantificação Relativa do DNA.

Para análise de qPCR foram utilizados genes específicos para bactérias ***Firmicutes*** e ***Bacteroidetes***, utilizando como gene de referencia o gene 16sRNA, região existente em todas as bactérias (Tabela 4).

As reações foram realizadas em um volume final de 25µL contendo: 12,5µL de *Planium® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen)*; 1µL de *primer* sense; 1µL de *primer* anti-sense; 1µL do *template* (DNA extraído anteriormente do pool de cada grupo experimental) e quantidade de água ultra pura autoclavada para completar o volume final de 25µL.

As condições utilizadas para a amplificação foram descritas por FIERER et al., 2005 e GUO et al., 2008. Sendo uma desnaturação inicial a 95°C durante 10 minutos, acompanhado de 40 ciclos sequentes de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 60 segundos e 72°C durante 45 segundos. No fim de cada incubação a 72°C será medida a fluorescência.

Tabela 4 - Primers que serão utilizados para a quantificação de genes específicos no qPCR

Primer	Sequencia	Tam. (pb)	Temp °C	Referencia
<i>Firmicutes:</i>				
Firm934F	5'-GGAGYATGTCCTTTAATTCTGAAGCA-3'	126	60	Guo et al., 2008
Firm1060R	5'-AGCTGACGACAACCATGCAC-3'			
Bacterioidetes:				
Bact934F	5'- GGARCATGTGGTTTAATTTCGATGAT-3'	126	60	Guo et al., 2008
Bact1060R	5'- AGCTGACGACAACCATGCAG-3'			
All bacteria:				
Eub338F	5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'	200	60	Fierer et al. 2005
Eub518R	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'			

O método utilizado para a quantificação das amostras foi a quantificação relativa com a utilização do cálculo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para avaliação da quantidade Bacterioidetes e Firmicutes foram utilizados genes específicos para sua detecção (Tabela 4).

Como gene de referencia foram utilizados primers específicos para amplificação da região 16RNAs (universal) e como amostra controle o DNA do grupo "A", extraído antes do tratamento. Desta maneira todas as demais quantificações se deram tendo como base a amostra controle (controle negativo) que teve a quantificação marcada com valor "1", e os demais foram comparados com esta referência.

5 RESULTADOS

Os resultados estão em formato de artigo científico.

O artigo está em avaliação na revista, AJIC American Journal of Infection Control.

Anexo A

Evaluation of gut microbiota and weight alterations after the administration of tetracycline and *Lactobacillus gasseri* in rats

Fernando Siqueira Olimpio; Prof¹; Fernando de Sá Del Fiol; Ph.D¹; Renata Lima; Ph.D¹; Karina Sene Rosa²; Guilherme Augusto Sanches Roque²; Cintia Villalta Santos².

1. University of Sorocaba - Pharmacology Dept. 2. University of Sorocaba - Veterinary Students

ABSTRACT

Obesity is currently one of the largest public health problems, and current studies suggest that changes in the intestinal microbiota can cause disorders of the microbiota (dysbiosis), which eventually lead to obesity. The gut microbiota is directly influenced by the use of prebiotics, probiotics and antibiotics because these treatments alter the quantities of bacterial species. It is currently known that the intestinal microbiota is stable and typically composed primarily of the phyla Firmicutes and Bacteroidetes. Changes caused by antibiotics can interfere directly with the proportions of these phyla, affecting the energy balance of the host. This study evaluated possible interference with the gut microbiota caused by the administration of tetracycline and *Lactobacillus gasseri* in 72 rats from two generations. Each generation was divided into three experimental groups: tetracycline (n = 12), tetracycline and *L. gasseri* (n = 12) and control (n = 12). The second generation was composed of the progeny of the first generation. The treatments were performed in 4 doses over 10 days. Anthropometric analyses were conducted using molecular analysis and qPCR in stool samples to investigate the relative quantities of the phyla Firmicutes and Bacteroidetes before and after treatment. The results showed that an increase in weight and body mass index (BMI) occurred in animals treated with tetracycline alone. The use of the probiotic in combination with the antibiotic protected the animals from the pro-obesity effect of the antibiotic. Molecular analysis showed that in animals treated with tetracycline, a change in the proportions of Firmicutes and Bacteroidetes bacteria occurred, which was likely the cause of the increased weight and BMI. The use of a probiotic in combination with an antibiotic treatment can protect against the pro-obesity effect of antibiotic use, especially in children.

Keywords: obesity; antibiotics; probiotics; gut microbiota.

INTRODUCTION

In recent years, obesity has become a major public health challenge and is being treated as a pandemic, particularly in Western countries [1]. Obesity has a multifactorial etiology and develops differently in each individual, with the following main causes: genetic inheritance, lack of physical activity, behavioral and cultural habits of modern life, high-fat diets and the gradual replacement of humans by mechanized activities [2].

Some studies [3, 4] have linked the use of antibiotics to changes in the gut microbiota and a consequent increase in the absorption of body fat and weight gain; thus, antibiotic use may be responsible for the worldwide obesity epidemic that occurred in the last 50 years and coincides with the massive use antibiotics [5, 6]. The authors report that changes in the gut microflora caused by antibiotics can interfere with the body's metabolism and energy balance. This phenomenon is known as dysbiosis [2, 5].

The human intestinal tract is home to a diverse and complex microbial community called the gut microbiota, which plays a central role in human health. The gut is colonized by more than 400 species of bacteria, which encode approximately 100 times the number of genes present in the human genome [7].

The human gut microbiota contains approximately 100 trillion bacterial cells that belong predominantly to four bacterial phyla: Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, and Bacteroidetes. These last two phyla account for approximately 90% of the organisms found in the gut microbiota [2, 8]. The large number of microorganisms present in the gut, as well as the immense variety and functions of those microorganisms, has led some authors to refer to the intestinal microbiota as a new human organ [2, 9-11].

Although fairly stable in adulthood, the qualitative and quantitative composition of the gut microbiota is strongly influenced by numerous factors, such as age, gender, geography, diet, and environmental factors, such as exposure to antibiotics, especially in children and newborns [6, 12-16]. After early childhood, a stabilization of the gut microbiota occurs, and the ecosystem is dominated by the phyla Firmicutes and Bacteroidetes [17]. The ratio of the amounts of Firmicutes and Bacteroidetes in

the guts of humans and animals appears to be the determining factor for increases or decreases in caloric gain and subsequent weight gain [18-21].

Some studies have shown that the microbial changes (dysbiosis) caused by the ingestion of antibiotics and/or probiotics can lead to changes in weight and body fat due to changes in the proportions of Firmicutes and Bacteroidetes [22-26].

In a recent meta-analysis, Million et al. showed that the administration of *Lactobacillus* species as probiotics was associated with significant weight changes. The *L. acidophilus* species *L. ingluviei* and *L. fermentum* were associated with weight gain, and the use of *L. plantarum* and *L.gasseri* was associated with weight loss [27].

This paper aims to evaluate the effects of treatment with the antibiotic tetracycline and *L.gasseri* on the gut microbiota of rats (based on the Bacteroidetes: Firmicutes ratio), as well as the possible influence on weight and body mass.

MATERIAL AND METHODS

Administered treatments:

The experiment was divided into two stages, which each used 36 rats. In each stage, the animals were divided into three experimental groups, with the following treatments:

CONTR group = control group, with 12 animals (6 males and 6 females) that received 0.5 ml of NaCl (0.9%) on treatment days.

TETRA Group = tetracycline group, with 12 rats (6 males and 6 females) that received 50 mg/kg/day of tetracycline orally on treatment days.

TETRA+LG Group = tetracycline and *L.gasseri* group, with 12 rats (6 males and 6 females) that received 50 mg/kg/day of tetracycline orally followed one hour later by 0.5 mL of saline containing 108 cfu of *L.gasseri* on treatment days.

The thirty-six animals in the first stage were divided into 6 pairs per group. All animals used in the first stage arrived at the vivarium when they were 21 days old and remained in the vivarium until they were 94 days old, when the first stage ended.

Table 1 - Days of life and procedures performed

Days of life	Procedure		
	Treatment	Anthropometry	Feces analysis
21		Adaptation period	
31			X
41	X	X	
44	X		
47	X		
50	X		
57		X	
94		X	X

For anthropometric measurements, we used only males because pregnant females interfere with that assessment. The second stage was composed of the offspring that resulted from the first stage, and only male offspring were used, starting when the pups were 21 days old. The same procedures outlined in Table 1 were performed on the animals used in stage 2, except for the feces analysis, which was not carried out in stage 2.

Administered treatments: After the preparation of the tetracycline and *L. gasseri*, the doses were adjusted for the animals as follows: 50 mg/kg of tetracycline was suspended in saline (0.9% NaCl), and 10^8 cfu/ml of *L. gasseri* was also suspended in saline. The control group received saline only. In all groups, the treatments were performed on four different days and administered orally using a gavage technique.

Evaluation of Firmicutes:Bacteroidetes ratio in feces

The Firmicutes:Bacteroidetes ratio was determined only at the end of the first stage. Feces samples were collected individually from each experimental group. The samples were placed in 2 ml tubes and stored (-80°C) until the time of DNA extraction.

For the qPCR analysis, we used genes specific to Firmicutes and Bacteroidetes bacteria, using as a reference gene the 16s RNA gene region, which exists in all bacteria. The reactions were performed in a final volume of 25 μ L, which contained: 12.5 μ L of Planium® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with Rox (Invitrogen); 1 μ L of the sense primer; 1 μ L of the antisense primer; 1 μ L of template

(DNA extracted from stool samples) and autoclaved ultrapure water to bring the final volume to 25 μ L. The conditions used for amplification were described previously [28, 29].

The method used to quantify the results was relative quantification using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ calculation. This approach is often used for relative quantitation, as it enables the calculation of the dose without the need to perform a standard curve, which is possible because the method assumes that the efficiencies of the reactions are equal. For relative quantitation performed using $2^{-\Delta\Delta C_t}$, an endogenous control is required; in this work, we used the bacterial 16S RNA gene.

Weight Gain Assessment and Body Mass Index

To evaluate weight gain, the animals were weighed, and anthropometric measurements (measurements of the abdominal and thoracic circumference, weight and length) were obtained 3 times per stage: on the first day of treatment, at 41 days old, at 57 days old, and at 94 days old.

Anthropometric evaluations of the animals were performed as described previously [30, 31]. Anthropometric measurements were made with a non-extensible tape measure with an accuracy of 0.1 cm. All measurements were made on anesthetized animals. In addition to the anthropometric data, the body weight was assessed, and the body mass index (BMI) was calculated by dividing the mass of the animal by the square of the animal's height [15].

Statistical Analysis

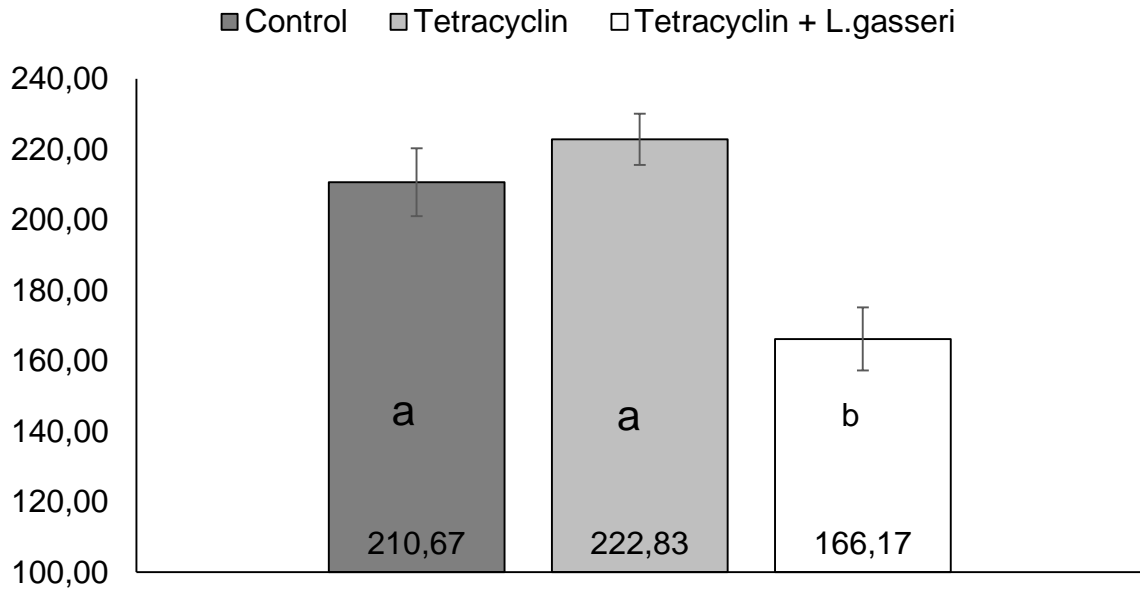
All measurements were made twice. The statistical significance of differences among the three groups was calculated using a two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey-Kramer test. A difference between groups was considered to be statistically significant when the p value was <0.05 .

RESULTS

Weight and BMI

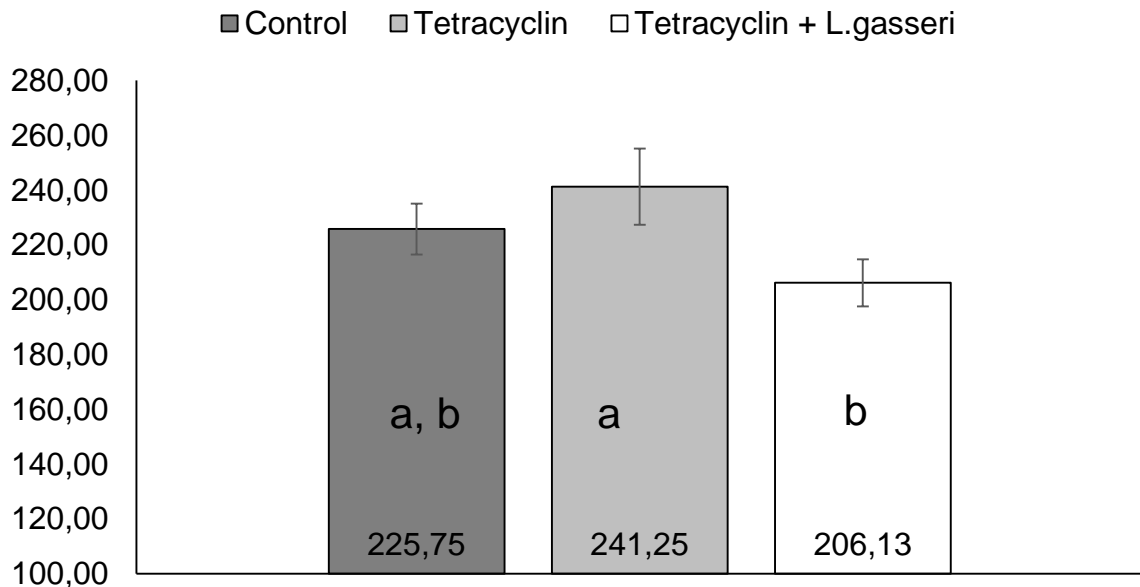
Weight gain.

Figure 1 - Weight gain (g) and standard deviation of the groups in stage 1



Different letters indicate statistical significance ($p < 0.05$).

Figure 2 - Weight gain (g) and standard deviation of the groups in stage 2.



Different letters indicate statistical significance ($p < 0.05$).

The data presented in Figures 1 and 2 show that during stage 1 (Figure 1), the group of animals that gained less weight was the group that received tetracycline in

combination with *L.gasseri* (166.17 g), with statistically significant differences ($p<0.05$) from the group that received the antibiotic alone and the control group. For stage 2 (puppies), the result was similar, with less weight gain for the group that received the antibiotic in combination with *L.gasseri*; however, this difference was only significant ($p<0.05$) in comparison to the group that received the tetracycline alone. Importantly, the group that received tetracycline alone exhibited the greatest weight gain in the two assessed stages, although this difference did not reach significance.

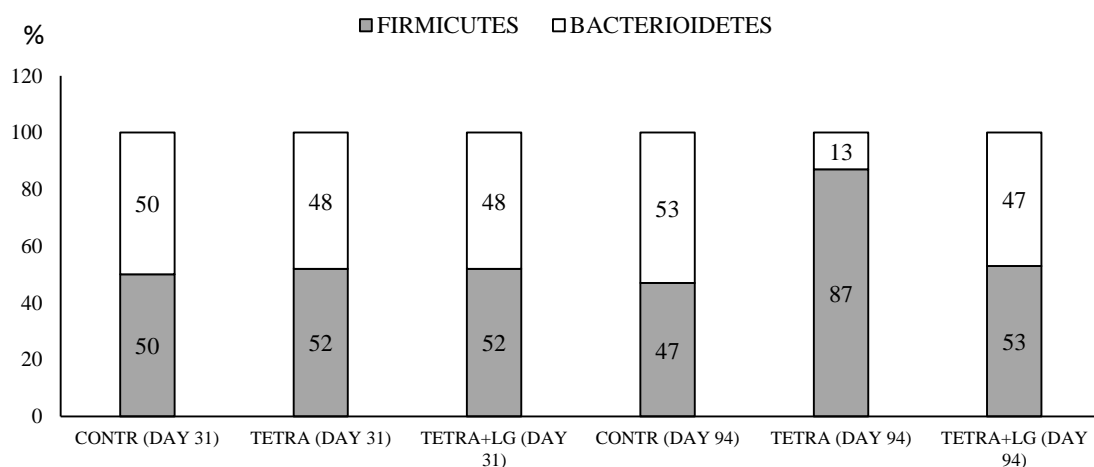
Table 2 - BMIs of the animals at the end of stages 1 and 2.

	STAGE 1			STAGE 2		
	BMI	SD	Statistics	BMI	SD	Statistics
Control	0.628	0.025	a	0.630	0.051	a
Tetracycline	0.686	0.044	b	0.666	0.051	a
Tetracycline + <i>L. gasseri</i>	0.610	0.042	a	0.677	0.018	a

Different letters indicate statistical significance ($p<0.05$).
SD – Standard Deviation

Table 2 shows the BMIs of the animals at the end of each stage. At the end of stage 2, there was no difference between the groups, which all presented the same BMI. In stage 1, the group that had the highest BMI was the group of animals that received the tetracycline alone, which was similar to the result obtained concerning the weights of the animals, as presented in Figures 1 and 2.

Figure 3 - Firmicutes:Bacteroidetes ratios (%) in the animals' feces at the beginning and end of stage 1.



The data presented in Figure 3 show that the Firmicutes:Bacteroidetes ratio remained stable when compared within the groups between the start (Day 31) and

the end of treatment (Day 49). An exception occurred in the group treated with tetracycline alone, for which the ratio changed from 52:48 to 87:13 ($p < 0.001$).

These results indicate that tetracycline significantly interferes with the gut microbiota by strongly altering the Firmicutes:Bacteroidetes ratio, with a prevalence of Firmicutes at the end of treatment. When tetracycline was administered at the same dose but combined with *L.gasseri*, these effects were not observed, possibly due to the presence of the probiotic.

DISCUSSION

The results obtained concerning the animals' weight gain show that the group of animals that received tetracycline alone had a greater weight gain, which reached statistical significance in stage 1 in comparison to the group that received the antibiotic in combination with the probiotic. The use of *L.gasseri* was associated with less weight gain. These data are well documented in the literature, showing that especially during childhood, the use of antibiotics can alter the microflora (dysbiosis), leading to greater weight gain and increased body fat. The role of the microbiota in the development of obesity has been studied extensively in humans and animals and may involve the following possible causes: the digestion of nondigestible polysaccharides; microbiota regulation of the dietary energy supply; and the production or activation of markers involved in the animal's metabolism [6, 32-36].

The use of *L.gasseri* in humans causes decreased abdominal fat and body weight [37, 38]. In animals, the use of this bacterium has been associated with decreased weight [36, 39, 40], visceral fat and adipocyte size [38, 41, 42]. In this study, the addition of the probiotic to the antibiotic treatment protected the animals from the pro-obesity effect of the antibiotic, with a strong reduction of weight in animals treated with *L. gasseri*.

The results obtained concerning the ratio of Firmicutes and Bacteroidetes showed that in addition to promoting weight gain in the animals, the administration of tetracycline alone significantly changed the Firmicutes:Bacteroidetes ratio; this imbalance was probably responsible for the increased weight and BMI of the animals. Other studies have shown similar results [22, 43, 44].

The relationship between the gut microflora and increases in weight, as well as the effect of antibiotics on the microbiota, are already confirmed in the literature.

This study suggests that especially in children, the treatment of infectious diseases can be accomplished with the aid of biological adjuvants (probiotics), with the sole purpose of preventing the dysbiosis phenomenon, which may predispose children to weight gain and obesity.

REFERENCES

1. Murphy, E.F., et al., Antimicrobials: Strategies for targeting obesity and metabolic health? *Gut Microbes*, 2013. 4(1): p. 48-53.
2. Riley, L.W., E. Raphael, and E. Faerstein, Obesity in the United States - dysbiosis from exposure to low-dose antibiotics? *Front Public Health*, 2013. 1: p. 69.
3. Robinson, C.J. and V.B. Young, Antibiotic administration alters the community structure of the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes*, 2010. 1(4): p. 279-284.
4. Rettedal, E., et al., Alteration of the ileal microbiota of weanling piglets by the growth-promoting antibiotic chlortetracycline. *Appl Environ Microbiol*, 2009. 75(17): p. 5489-95.
5. Cho, I., et al., Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature*, 2012. 488(7413): p. 621-6.
6. Trasande, L., et al., Infant antibiotic exposures and early-life body mass. *Int J Obes (Lond)*, 2013. 37(1): p. 16-23.
7. Guinane, C.M. and P.D. Cotter, Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therap Adv Gastroenterol*, 2013. 6(4): p. 295-308.
8. Tilg, H. and A. Kaser, Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *J Clin Invest*, 2011. 121(6): p. 2126-32.
9. Lankelma, J.M., et al., [The gut microbiota in sickness and health]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 2014. 157: p. A5901.
10. Putignani, L., et al., The human gut microbiota: a dynamic interplay with the host from birth to senescence settled during childhood. *Pediatr Res*, 2014. 76(1): p. 2-10.
11. Quigley, E.M., Gut bacteria in health and disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 2013. 9(9): p. 560-9.
12. Agans, R., et al., Distal gut microbiota of adolescent children is different from that of adults. *FEMS Microbiol Ecol*, 2011. 77(2): p. 404-12.
13. Vael, C., et al., Intestinal microflora and body mass index during the first three years of life: an observational study. *Gut Pathog*, 2011. 3(1): p. 8.
14. Markle, J.G., et al., Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science*, 2013. 339(6123): p. 1084-8.
15. Grzeskowiak, L., et al., Distinct gut microbiota in southeastern African and northern European infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2012. 54(6): p. 812-6.

16. Backhed, F., et al., Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 2005. 307(5717): p. 1915-20.
17. Angelakis, E., et al., The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiol*, 2012. 7(1): p. 91-109.
18. Turnbaugh, P.J., et al., A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 2009. 457(7228): p. 480-4.
19. Li, M., et al., Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(6): p. 2117-22.
20. Collado, M.C., et al., Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *Am J Clin Nutr*, 2008. 88(4): p. 894-9.
21. Schwartz, A., et al., Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)*, 2010. 18(1): p. 190-5.
22. Ley, R.E., et al., Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 2006. 444(7122): p. 1022-3.
23. Xu, P., et al., Correlation of intestinal microbiota with overweight and obesity in Kazakh school children. *BMC Microbiol*, 2012. 12: p. 283.
24. Turnbaugh, P.J., et al., Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*, 2008. 3(4): p. 213-23.
25. Bibiloni, M.D., A. Pons, and J.A. Tur, Prevalence of Overweight and Obesity in Adolescents: A Systematic Review. *ISRN Obes*, 2013. 2013: p. 392747.
26. Voreades, N., A. Kozil, and T.L. Weir, Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Front Microbiol*, 2014. 5: p. 494.
27. Million, M., et al., Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. *Microb Pathog*, 2012. 53(2): p. 100-8.
28. Guo, X., et al., Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Lett Appl Microbiol*, 2008. 47(5): p. 367-73.
29. Fierer, N., et al., Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl Environ Microbiol*, 2005. 71(7): p. 4117-20.
30. Novelli, E.L., et al., Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim*, 2007. 41(1): p. 111-9.
31. Bernardis, L.L., Prediction of carcass fat, water and lean body mass from Lee's "nutritive ratio" in rats with hypothalamic obesity. *Experientia*, 1970. 26(7): p. 789-90.
32. Perrini, F., [Aureomycin as growth factor in prematures]. *Boll Soc Ital Biol Sper*, 1951. 27(7-8): p. 1151-2.
33. Southern, K.W., et al., Macrolide antibiotics for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012. 11: p. CD002203.

34. Macdougall, L.G., The effect of aureomycin on undernourished African children. *J Trop Pediatr*, 1957. 3(2): p. 74-81.
35. Garly, M.L., et al., Prophylactic antibiotics to prevent pneumonia and other complications after measles: community based randomised double blind placebo controlled trial in Guinea-Bissau. *BMJ*, 2006. 333(7581): p. 1245.
36. de Sa Del Fiol, F., et al., Obesity and the use of antibiotics and probiotics in rats. *Chemotherapy*, 2014. 60(3): p. 162-7.
37. Kadooka, Y., et al., Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr*, 2010. 64(6): p. 636-43.
38. Jung, S.P., et al., Effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on Overweight and Obese Adults: A Randomized, Double-Blind Clinical Trial. *Korean J Fam Med*, 2013. 34(2): p. 80-9.
39. Kang, J.H., et al., Anti-obesity effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 in high-sucrose diet-induced obese mice. *PLoS One*, 2013. 8(1): p. e54617.
40. Kang, J.H., S.I. Yun, and H.O. Park, Effects of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on body weight and adipose tissue mass in diet-induced overweight rats. *J Microbiol*, 2010. 48(5): p. 712-4.
41. Hamad, E.M., et al., Milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 influences adipocyte size via inhibition of dietary fat absorption in Zucker rats. *Br J Nutr*, 2009. 101(5): p. 716-24.
42. Sato, M., et al., Effects of milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 on adipocyte size in rats. *Br J Nutr*, 2008. 99(5): p. 1013-7.
43. Ley, R.E., et al., Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(31): p. 11070-5.
44. Turnbaugh, P.J., et al., An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 2006. 444(7122): p. 1027-31.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A relação entre a microbiota intestinal e o aumento de peso já está consolidada na literatura, bem como a interferência de antibióticos com a microbiota, de forma que este estudo propõe que tratamentos de doenças infecciosas, especialmente em crianças podem ser feitos com o auxílio de adjuvantes biológicos (probióticos), com o único propósito de impedir o fenômeno da disbiose, que poderá predispor crianças, a aumento de peso e as consequências da obesidade. Os resultados relativos ao ganho de peso dos animais mostram que o grupo de animais que recebeu a tetraciclina isoladamente, apresentou maior ganho de peso, com significância estatística na fase 1, quando comparado ao grupo que recebeu o antibiótico associado ao probiótico. A utilização do *L.gasseri*, esteve associada ao menor ganho de peso..

A utilização do *L.gasseri* mostrou diminuições na gordura abdominal e no peso corporal nos animais estudados, mostrando similaridade com a literatura. No presente estudo, percebe-se de forma muito clara que a adição do probiótico ao tratamento com o antibiótico protegeu os animais de um efeito pró-obesidade do antibiótico, apontando, fortemente, para uma redução de peso nos organismos tratados com o *L.gasseri*.

Os dados referentes à proporção entre Firmicutes e Bacteroidetes mostrou que a tetraciclina, administrada de forma isolada, além de favorecer o ganho de peso dos animais, alterou, de forma significativa o equilíbrio na proporção Firmicutes: Bacteroidetes, sendo este desequilíbrio, o provável responsável pelo aumento de peso dos animais e da BMI.

CONCLUSÕES

1. A utilização de tetraciclina, nas condições do experimento, interferiu na microbiota intestinal dos animais, alterando a relação Firmicutes:Bacteroidetes.
2. A tetraciclina interferiu no peso e no IMC dos animais, aumentando-os.
3. A utilização do *L.gasseri* protegeu as alterações na microbiota promovidas pela tetraciclina, bem como os efeitos no peso e IMC dos animais

REFERÊNCIAS

AGANS, Richard et al. Distal gut microbiota of adolescent children is different from that of adults. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 77, p. 404-412, jun. 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6941.2011.01120.x/pdf>>. Acesso em: 05 ago. 2014.

AJSLEV, Teresa et al. Childhood overweight after establishment of the gut microbiota: the role of delivery mode, pre-pregnancy weight and early administration of antibiotics. **International Journal of Obesity**, n. 35, p. 522-529, abr. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/ijo/journal/v35/n4/full/ijo201127a.html>>. Acesso em: 05 jun. 2014.

ANGELAKIS, Emmanouil et al. Related actions of probiotics and antibiotics on gut microbiota and weight modification. **Lancet Infectious Diseases**, Marselha, v. 13, n. 10, p. 889–99, out. 2013. Disponível em: <[http://www.thelancet.com/pdfs/journals/laninf/PIIS1473-3099\(13\)70179-8.pdf](http://www.thelancet.com/pdfs/journals/laninf/PIIS1473-3099(13)70179-8.pdf)>. Acesso em: 17 out. 2015.

ANGELAKIS, Emmanouil et al. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. **Future Microbiology**, London, jul. 2012. Disponível em <<http://www.futuremedicine.com/doi/pdfplus/10.2217/fmb.11.142>>

ARUMUGAM, Manthiram et al. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, Reino Unido, v. 473, n. 7346, p. 174-180, maio 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3728647/pdf/emss-52942.pdf>>. Acesso em 17 out. 2015.

BALAMURUGAN, R et al. Quantitative differences in intestinal *Faecalibacterium prausnitzii* in obese Indian children. **The British Journal of Nutrition**. v. 103, n.3, p. 335-338, fev. 2010. Disponível em: <http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FBJN%2FBJN103_03%2FS0007114509992182a.pdf&code=120f768a7a525041e4a6c55bf429b91c>. Acesso em 12 abril 2016.

BIBILONI, Maria Del Mar.; PONS, Antoni.; TUR, Josep A. Prevalence of overweight and Obesity in Adolescents: A Systematic Review. **International Scholarly Research Notices**, v. 2013, ago. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/392747>>. Acesso em: 05 ago. 2014.

CAITRIONA, Guinane; COTTER, Paul. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, Nova York, v. 6, n. 4, p. 295–308, jul. 2013. Disponível em: <<http://tag.sagepub.com/content/6/4/295.full.pdf+html>>. Acesso em: 17 out. 2015.

CHO, Ilseung. et al. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. **Nature**, v. 488, ago. 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v488/n7413/pdf/nature11400.pdf#affil-auth>>. Acesso em: 05 jun. 2014.

COODIN, Fischel. Studies of terramycin in premature infants. **Pediatrics, Jornal of The American Academy of Pediatrics**, v. 12, n. 6, p. 652-656, dez. 1953. Disponível em: <<http://pediatrics.aappublications.org/content/12/6/652.full.pdf+html>> Acesso em: 16 out. 2015.

CORBO, S. et al. Effects of chlortetracycline on weight gain of Italian children ages 6 to 10 on diets relatively low in animal protein. **Antibiotics Annual**, v. 3, p. 19- 6, 1955. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13355240/full>>. Acesso em: 16 out. 2015.

COX, L. M.; BLASER, M. J. Antibiotics in early life and obesity. **Nature Reviews Endocrinology**, Reino Unido, n. 11, p. 182-190, dez. 2014. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrendo/journal/v11/n3/full/nrendo.2014.210.html>>. Acesso em: 17 out. 2015.

DE FILIPPO, Carlotta. et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 33, p. 14691-14696, ago. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2930426/>>. Acesso em: 17 out. 2015.

DE MAN J.C.; ROGOSA M.; SHARPE M. Elisabeth. A Medium for the Cultivation Of Lactobacilli. **Journal of Applied Microbiology**. v. 23, p. 130-135, 1960

DEL FIOL, F.S. et al. Obesity and the use of antibiotics and probiotics in rats. **Chemotherapy**. v.60, n.03, p. 162-167. Sorocaba, 2014. FONTELLES, M.J. et al. Metodologia da pesquisa: diretrizes para o cálculo do tamanho da amostra. *Rev Paran Med*. 2010;24:57-64.

GILBERT, David et al. *The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy* 2013. 43 ed. Sperryville: Antimicrobial Therapy. Sanford Guide, abr. 2013.

GRZESKOWIAK, Lukasz et al. Distinct gut microbiota in southeastern African and northern European infants. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, n. 54, v. 6, p. 812-826, jun. 2012. Disponível em: <http://pdfs.journals.lww.com/jpgn/2012/06000/Distinct_Gut_Microbiota_in_Southeastern_African.21.pdf>. Acesso em: 05 ago. 2014.

HAIGHT, T. H.; PIERCE, W. E. Effect of prolonged antibiotic administration of the weight of healthy young males. **The Journal of Nutrition Nutr.**, v. 56, p.15 1-161,

mai. 1955. Disponível em: < <http://jn.nutrition.org/content/56/1/151.long>> Acesso em: 16 out. 2015.

HAN, Joan C.; LAWLOR, Debbie A.; KIMM, Sue Y.S. Childhood Obesity – 2010: Progress and Challenges. **Revista Científica National Institutes of Health**, Londres, maio. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3073855/>>. Acesso em: 28 jun. 2014.

HAO, W. L.; LEE, Y. K. Microflora of the gastrointestinal tract: a review. **Methods in Molecular Biology**, v. 268, p. 491-502, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15156063?dopt=Abstract>>. Acesso em 16 out. 2015.

HELLWEGER, F. L.; XIAODAN, R. ; SANCHEZ, S. A Simple Model of Tetracycline Antibiotic Resistance in the Aquatic Environment (with Application to the Poudre River). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Boston, v. 8, n. 2, p. 480-497, 2011. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-4601/8/2/480/htm>>. Acesso em: 15 out. 2015.

HUNTER, Jennie Cevera; BELT, Angela. Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry. Academic Press, 1996.

HUTTENHOWER, C. et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, Reino Unido, v. 486, n. 7402, p. 207-214, jun. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3564958/>>. Acesso em 17 out. 2015.

ITAGI, V.; PATIL, R. Obesity in children and adolescents and its relationship with hypertension. **Turkish Journal Of Medical Sciences**, Turquia, v. 2, n. 41, p. 259-266, 2011. Disponível em: <<http://journals.tubitak.gov.tr/medical/issues/sag-11-41-2/sag-41-2-11-0912-417.pdf>>. Acesso em: 17 out. 2015.

KALLIOMÄKI, M. et al. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 3, p. 534-538, mar. 2008. Disponível em: <<http://ajcn.nutrition.org/content/87/3/534.long>>. Acesso em: 16 out. 2015.

KIRSOP, B. E. ; DOYLE, A. Maintenance of Microorganisms and Cell Cultures. **Manual of Laboratory Methods**. 2 ed. London, academic Press 1991.

LEPAGE, P.; LECLERC, M.C.; JOOSSENS, M. et al. A metagenomic insight into our gut's microbiome. **Journal Gut**, v. 62, p. 146-158, 2013. Disponível em: <<http://gut.bmj.com/content/early/2012/04/22/gutjnl-2011-301805>>. Acesso em: 17 out. 2015.

LIBBY, D. A.; SCHAIBLE, P.J. Observations on growth responses to antibiotics and arsonic acids in poultry feeds. **Science**, n. 3151, v. 121, p. 733-734, maio 1955.

- MACFARLANE G.T.; MACFARLANE, S. Fermentation in the human large intestine: its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, Philadelphia, v. 45, p. 120-127, 2011. Disponível em: <<http://journals.lww.com/jcge/pages/articleviewer.aspx>>. Acesso em 16 out. 2015.
- MARKLE, J. G. et al. Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. **Science**, n. 339, p. 1084-5, mar. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/pmidlookup?view=long;pmid=23328391>>. Acesso em: 05 ago. 2014.
- 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. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856413001690>>. Acesso em: 15 out. 2015.
- MILLION, M. et al. Gut bacterial microbiota and obesity. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Marseille, v. 19, n. 305-313, abr. 2013. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1469-0691.12172/pdf>>. Acesso em: 05 jun. 2014.
- MURO, M. A.; LUCHI, M. R. Preservação de Microrganismos. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello, 1989. 70 páginas.
- MURPHY, E. F. et al. Antimicrobials: Strategies for targeting obesity and metabolic health?. **Gut Microbes**, Cork, fev. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3555886/>>. Acesso em: 28 jun. 2014.
- NOVELLI, E.L. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, n. 41, v. 1, p. 111-119, jan. 2007. Disponível em: <<http://lan.sagepub.com/content/41/1/111.long>>. Acesso em: 05 ago. 2014.
- OLIVER, Goulet. Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. **Nutrition Reviews**, Oxford v. 73, p 32-40, jul. 2015. Disponível em: http://nutritionreviews.oxfordjournals.org/content/73/suppl_1/32.full-text.pdf. Acesso em: 16 out. 2015.
- OWEN, C. et al. The effect of infant feeding on the risk of obesity across the life course: a quantitative review of published evidence. **Pediatrics**, v. 115, n. 5, maio 2005. Disponível em: < <http://pediatrics.aappublications.org/content/115/5/1367.long>>. Acesso em: 20 out. 2015.
- PALONE, M. R. T. et al. Fatores modificadores da microbiota gastrointestinal e sua relação com malformações craniofaciais. **Revista da Faculdade de Ciências**

Médicas de Sorocaba, Sorocaba, v.16, n.2, p. 107-108, 2014. Disponível em: <<http://revistas.pucsp.br/index.php/RFCMS/article/view/19106/pdf>>. Acesso em: 24 out. 2015.

PATTERSON, P. R. Minocycline in the antibiotic regimen of cystic fibrosis patients: weight gain and clinical improvement. **Clin Pediatr (Phila)**, v. 16, p. 60-63, jan. 1977. Disponível em: < <http://aop.sagepub.com/content/49/4/458.full>> Acesso em: 16 out. 2015.

PAYNE, M. S.; BAYATIBOJAKHI, S. Exploring preterm birth as a polymicrobial disease: an overview of the uterine microbiome. **Frontiers Immunology**. Suíça, n. 5, p. 595, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4245917/pdf/fimmu-05-00595.pdf>>. Acesso em 17 out. 2015.

PENDERS, J. et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. **Pediatrics**, Chicago, v. 118, n. 2, p. 511-521, ago. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16882802>>. Acesso em: 17 out. 2015.

QIN, J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v. 464, mar. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v464/n7285/pdf/nature08821.pdf>>. Acesso em: 17 out. 2015.

RETTEDAL, E. et al. Alteration of the ileal microbiota of weanling piglets by the growth-promoting antibiotic chlortetracycline. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, p. 5489- 5495, jul. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2737922/pdf/2220-08.pdf>> Acesso em: 16 out. 2015.

RILEY, Lee W.; RAPHAEL, Eva; FAERSTEIN, Eduardo. Obesity in the United States - dysbiosis from exposure to low-dose antibiotics? **Frontiers in Public Health**, Suíça, dez. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3867737/pdf/fpubh-01-00069.pdf>>. Acesso em: 21 jul. 2014.

RODRÍGUEZ, M. A. R. et al. Tetraciclina. **ACTA Medica**, Portugal, v. 1, n. 8, p. 75-79, 1998. Disponível em: <http://bvs.sld.cu/revistas/act/vol8_1_98/act11198.htm>. Acesso em: 15 out. 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Boletim O que é a Obesidade? Disponível em: <<http://www.endocrino.org.br/obesidade/>> Acesso em: 15 out. 2015.

SOKOL, H.; SEKSIK P.; FURET J. P. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 15, p. 1183-1189, ago. 2009.

Disponível em: <<http://journals.lww.com/ibdjournal/pages/default.aspx>>. Acesso em 17 out. 2015.

SOLT, I, The human microbiome and the great obstetrical syndromes: a new frontier in maternal-fetal medicine. **Best Practice ; Research Clinical Obstetrics ; Gynaecology**. v. 9, n. 6, p. 165-175, fev. 2015. Disponível em: <[http://www.bestpracticeobgyn.com/article/S1521-6934\(14\)00172-2/fulltext](http://www.bestpracticeobgyn.com/article/S1521-6934(14)00172-2/fulltext)>. Acesso em: 17 out. 2015.

TANNOCK, G.W., Normal Microflora. 1. ed. London: Chapman ; Hall, 1995.

THUNY, F. et al. Vancomycin treatment of infective endocarditis is linked with recently acquired obesity. **PLoS ONE**, Marselha, v.5, n.2, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0009074;representation=PDF>>. Acesso em: 24 out. 2015.

TOIVANEN, P.; VAAHTOVUO, J.; EEROLA, E. Influence of Major Histocompatibility Complex on Bacterial Composition of Fecal Flora. **infection and immunity**, Washington, v. 69, n. 4, p 2372-2377 2001. Disponível em: <<http://iai.asm.org/content/69/4/2372.full.pdf+html>>. Acesso em: 16 out. 2015.

TRASANDE, L. et al. Infant antibiotic exposures and early-life body mass. **International Journal of Obesity**, n. 37, p. 16-23, ago. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/ijo/journal/v37/n1/pdf/ijo2012132a.pdf>>. Acesso em: 05 ago. 2014.

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. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v444/n7122/abs/nature05414.html>>. Acesso em: 17 out. 2015.

VAEL, C. et al. Intestinal microflora and body mass index during the first three years of life: an observational study. **Gut pathogens**, v. 3, n. 8, maio. 2011. Disponível em: <<http://www.gutpathogens.com/content/pdf/1757-4749-3-8.pdf>>. Acesso em: 05 ago. 2014.

WFCC Executive Board, the. World Federation for Culture Collections: Guidelines for the Establishment and Operation of Collections of Cultures of Microorganisms. 3rd. Edition, 2010. 19 pages.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 20 out. 2015.

WU, G. D., et al. Linking long- erm dietary patterns with gut microbial enterotypes. **Science**, Nova York, v. 334, n. 6052, p. 105-108, set. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3368382/pdf/nihms378475.pdf>>. Acesso em: 17 out. 2015.

YIP, Y. L.; CHAN E. C. Y. Investigation of Host-Gut Microbiota Modulation of Therapeutic Outcome. **Drug Metabolism ; Disposition**, maio 2015. Disponível em: <<http://dmd.aspetjournals.org/content/early/2015/05/15/dmd.115.063750.full.pdf+html>>. Acesso em: 17 out. 2015

ZANG, Husen et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Arizona, fev. 2009. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/106/7/2365.full.pdf+html>>. Acesso em: 21 jul. 2014.

APÊNDICE A – COMITÊ DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SOROCABA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA-UNISO

PARECER

Protocolo nº 033/2015
Interessado (a): Fernando de Sá Del Fiol
Orientador (a): Fernando de Sá Del Fiol
Título do Projeto: Investigação da microbiota intestinal de animais expostos ao antibiotic tetraciclina utilizando qPCR
Título do Experimento: o mesmo

Apresentado à 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:

--

Nome: Renata de Lima

Coordenador da CEUA-Uniso

Assinatura: 

Data: 24/02/2015

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

Termo de Responsabilidade de Uso

Ao confirmar este Orçamento N°. 150249p, estou ciente de que receberei da Coleção de Culturas Tropical – Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello (CCT – FAT), CNPJ n°. 46.126.322/0001-82, a título de aquisição, para uso exclusivo, as linhagens n° CCT especificadas neste, comprometendo-me por seu(s) uso(s) e conservação / descarte seguros e adequados, sendo responsável pelo cumprimento das legislações vigentes e obrigações referentes ao recebimento e utilização de material microbiológico.

Fico ciente de que não caberá responsabilidade à CCT – FAT se o(s) microrganismo(s) for(em) danificado(s) ou inutilizado(s) por manipulação / estocagem inadequada, mau uso, negligência ou extravio.

A CCT – FAT não assume responsabilidade pelo descumprimento das leis e atribuições pelo cliente.

Observação: Este termo de responsabilidade e uso é válido por tempo indeterminado.

Informamos que o orçamento supracitado foi aprovado, ficando autorizada a execução do serviço com linhagem(ns) na forma:

<input checked="" type="checkbox"/>	Reativada(s) (<i>slants</i> em duplicata)
<input type="checkbox"/>	Liofilizada(s) (ampola simples)

Motivo da solicitação / uso do microrganismo (ex.: controle de qualidade, aplicação biotecnológica, finalidade didática, processos industriais, finalidade taxonômica, etc.):

Finalidade Didática

Comentários: O micro-organismo será utilizado na Pesquisa: Investigação da Microbiota Intestinal de Animais Expostos ao Antibiótico tetraciclina Utilizando Qpcr

Data
10/09/2015

Nome/Setor
Fernando Siqueira Olimpio

Assinatura



Os processos de preservação / manutenção das linhagens de microrganismos e sua distribuição obedecem às regras dadas pela WFCC (World Federation of Culture Collections), e se baseiam nas metodologias descritas em:

1. KIRBOP, B. E. & DOYLE, A. Maintenance of Microorganisms and Cell Cultures – A Manual of Laboratory Methods. 2nd. Edition, London, Academic Press, 1991, 308 pages.
2. HUNTER-CEVERA, J. C. & BELT, A. Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry. Academic Press, 1996, 279 pages.
3. MURO, M. A.; LUCHI, M. R. Preservação de Microrganismos. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello, 1989. 70 páginas.
4. WFCC Executive Board, the. World Federation for Culture Collections: Guidelines for the Establishment and Operation of Collections of Cultures of Microorganisms. 3rd. Edition, 2010. 19 pages.

ANEXO A – CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO DE ARTIGO

12/04/2016

Submission Confirmation - Fernando de Sá Del Fiol

Submission Confirmation

AJIC American Journal of Infection Control <ees.ajic.0.389411.8108b33d@eesmail.elsevier.com>

ter 12/04/2016 08:26

Para: Fernando de Sá Del Fiol <fernando.fiol@prof.uniso.br>; ferfiol@yahoo.com <ferfiol@yahoo.com>;

Dear Prof. Fernando Sá Sa Del Fiol,

Your submission entitled "Evaluation of gut microbiota and weight alterations after the administration of tetracycline and Lactobacillus gasseri in rats" has been received by American Journal of Infection Control

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is

<http://ees.elsevier.com/ajic/>.

Your username is: fernando.fiol@prof.uniso.br

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/ajic/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to the American Journal of Infection Control.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

American Journal of Infection Control

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.