

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO – UNIFENAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM REPRODUÇÃO, SANIDADE E BEM-ESTAR ANIMAL

EVANDRO NEVES SILVA

**INFLUÊNCIA DA DISBIOSE INTESTINAL INDUZIDA PELA AMOXICILINA NO
CICLO ESTRAL MURINO**

Alfenas – MG

2019

EVANDRO NEVES SILVA

**INFLUÊNCIA DA DISBIOSE INTESTINAL INDUZIDA PELA AMOXICILINA NO
CICLO ESTRAL MURINO**

Dissertação apresentada à Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Reprodução, Sanidade e Bem-Estar Animal para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Paiva Corsetti

Co-orientador: Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida

Alfenas – MG

2019

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Biblioteca Central da UNIFENAS

Silva, Evandro Neves

Influência da disbiose intestinal induzida pela amoxicilina no ciclo estral murino. — Evandro Neves Silva. — Alfenas, 2019.
67 f.

Orientadora: Prof^a Dra Patrícia Paiva Corsetti
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação
em Reprodução, Sanidade e Bem-Estar Animal -Universidade
José do Rosário Vellano, Alfenas, 2019.

1. Interleucinas 2. Penicilina 3. Antibióticos 4. *IL-1 β* , *IL-10*.
I. Universidade José do Rosário Vellano II. Título

CDU : 636.082.4:615(043)

Zélia Fernandes Ferreira Miranda

Bibliotecária CRB6 1486



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: "INFLUÊNCIA DA DISBIOSE INTESTINAL INDUZIDA PELA AMOXICILINA NO CICLO ESTRAL MURINO".

Autor: Evandro Neves Silva

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Paiva Corsetti

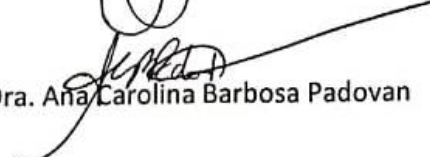
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM REPRODUÇÃO, SANIDADE E BEM-ESTAR ANIMAL** pela Comissão Examinadora.



Profa. Dra. Patrícia Paiva Corsetti
Orientadora

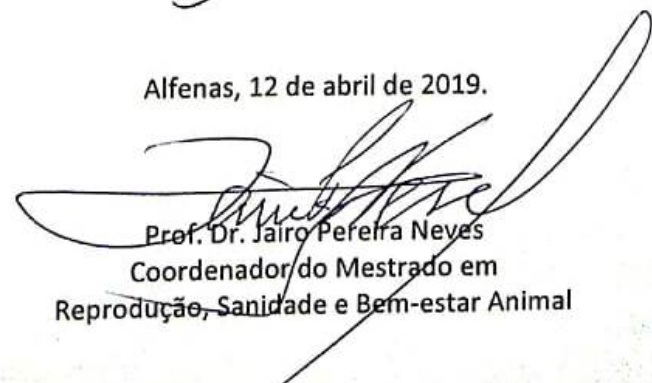


Prof. Dr. Jose Antonio Dias Garcia



Profa. Dra. Ana Carolina Barbosa Padovan

Alfenas, 12 de abril de 2019.



Prof. Dr. Jairo Pereira Neves
Coordenador do Mestrado em
Reprodução, Sanidade e Bem-estar Animal

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e força por ter chegado até aqui.

A professora Dra. Patrícia Paiva Corsetti, pela orientação, dedicação, paciência e profissionalismo. Sem ao menos me conhecer, estendeu sua mão e me aceitou como seu orientando, possibilitando meu amadurecimento, aprendizado e ampliação de meus horizontes. Muito obrigado!

Ao professor Dr. Leonardo Augusto de Almeida, pela co-orientação, colaboração e dedicação. Obrigado pelos conhecimentos transmitidos e pela parceria no desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus colegas do LIDIC, pela parceria, companheirismo, pela troca de experiências, pela convivência do dia-a-dia com boas gargalhadas, e por me auxiliarem nos experimentos e nas análises das amostras. Afinal, são minha segunda família!

Aos orientandos do Prof. Leonardo, do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNIFAL Caio, Natália, Jéssica e Gustavo, pelas trocas de experiências, pelos dias de experimentação em suas instalações e por terem se tornado meus amigos.

À UNIFENAS, em especial à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, com respaldo ao Programa de Reprodução, Sanidade e Bem-Estar Animal, pela oportunidade de participação do programa; aos professores e coordenação, pelos ensinamentos e aos colegas do programa, pela parceria nas aulas, nos seminários e nas discussões de casos.

A minha banca examinadora Dr. José Antônio Garcia e a Dra. Ana Carolina Padovan por aceitarem o convite e por me darem o prazer de agregarem novos conhecimentos e opiniões a minha dissertação. Obrigado!

Aos meus familiares, em especial, a minha mãe Michele (*in memoriam*), meu pai Dimas, meus tios e primos, pela paciência na minha ausência, pelo amor, pelo carinho e principalmente por acreditarem em mim. Amo vocês!

Aos meus eternos mestres amigos da Biomedicina/UNIFENAS, Luísa e Regiane, pelo apoio, amizade e por me despertarem o mundo acadêmico e sempre por me incentivarem para prosseguir essa caminhada.

A minha grande amiga/mãe que Alfenas me deu, Auxiliadora, pelo grande companheirismo de todas as horas, apoio e cuidados comigo durante a graduação e torcida para que eu finalizasse o Mestrado com êxito.

Aos meus eternos e novos amigos que conquistei, pela amizade, pelas “farras”, pelos momentos de descontração e pelos meus dias de ausência.

Ao CNPq e à CAPES, pelo incentivo à pesquisa (Código 001), pela bolsa a mim concedida, pois sem ela nada disso se realizaria.

RESUMO

A disbiose intestinal se refere ao desequilíbrio da microbiota, quando da proliferação exacerbada ou da diminuição de uma população específica de micro-organismos, sendo desencadeada por vários fatores, incluindo a utilização de antibióticos, tais como a amoxicilina, uma penicilina semissintética de moderado espectro. Uma vez que a disbiose intestinal está associada a uma grande variedade de condições imunopatológicas e reprodutivas, o principal objetivo deste estudo foi avaliar a disbiose intestinal induzida pela amoxicilina e sua influência sobre o ciclo estral de camundongos. Para isso, camundongos fêmeas da linhagem isogênica 129Sv/Ev foram tratados com 500mg/Kg de amoxicilina tri-hidratada ou solução salina tamponada de fosfato (PBS) por gavagem durante 15 dias. As fezes dos animais foram coletadas para análise da microbiota bacteriana fecal por metagenômica. Os animais tratados com amoxicilina apresentaram diferentes filos e grupos bacterianos em suas microbiotas fecais, quando comparadas com o grupo tratamento (PBS), mostrando uma maior proliferação de Proteobacterias e uma presença inferior de Bacteroidetes, demonstrando que o uso da amoxicilina induz a disbiose intestinal murina. Os camundongos disbióticos obtiveram um maior ganho de peso corporal quando comparados ao grupo controle PBS, e ambos os grupos não apresentaram morte de animais durante todo o procedimento. Durante os tratamentos, a citologia vaginal foi realizada por microscopia de campo claro, caracterizada por citometria de fluxo e visualização vaginal, determinando a fase do ciclo estral em que os animais se encontravam. As análises de citologia vaginal, a visualização vaginal e a citometria mostraram que a disbiose induzida pelo uso da amoxicilina alterou o ciclo estral dos animais e diminuiu o número de células totais presente nas fases do ciclo. Ademais, para caracterizar os possíveis parâmetros envolvidos na alteração do ciclo estral, amostras de ceco e ovários foram coletadas para a análise da expressão diferencial de genes codificadores de citocinas pró ou anti-inflamatória *IL-1 β* e *IL-10* por PCR em tempo real. A expressão de *IL-1 β* se apresentou aumentada no ceco e no ovário de animais disbióticos, quando comparados aos dos animais controles. Já a expressão de *IL-10*, se apresentou reduzida no grupo disbiótico em ambos os órgãos, quando comparados ao grupo controle. Sendo assim, os resultados indicam que o uso da amoxicilina induz a disbiose bacteriana intestinal, influenciando no ciclo estral murino e um estado pró-inflamatório no ceco e ovários dos camundongos.

Palavras-chave: Interleucinas, penicilina, antibióticos, *IL-1 β* , *IL-10*.

ABSTRACT

Intestinal dysbiosis refers to the imbalance of the gut microbiota when a specific microorganism population exacerbates or diminishes its proliferation being triggered by several factors, including the use of antibiotics, as amoxicillin, a semisynthetic penicillin of moderate spectrum. Since intestinal dysbiosis is associated with a great variety of immunopathological and reproductive conditions, the main goal of this study was to evaluate the intestinal dysbiosis caused by amoxicillin and its influence on the estrous cycle of mice. For this, female mice isogenic strain of 129Sv/Ev were treated with 500mg/Kg amoxicillin trihydrate or tamponade phosphate (PBS) by gavage for 15 days. Feces of the treated animals were collected for fecal bacterial microbiota population by metagenomics analysis. The amoxicillin-treated animals showed different phyla and bacterial groups in their feces microbiota when compared to the PBS-treated group, showing higher Proteobacteria proliferation and lower presence of Bacteroidetes, demonstrating that the use of amoxicillin induces intestinal dysbiosis. Dysbiotic mice gained body weight when compared to the PBS control group, and both groups did not show any deaths during the treatments. During the treatments, the vaginal cytology was performed by light microscopy, with cells characterization done by flow cytometry and physical evaluation of vaginal parameters performed to determine the estrous cycle phase. These analyses showed that the intestinal dysbiosis caused by the use of amoxicillin not only altered the estrous cycle but also decreased the number of cells present in the cycle phases. In addition, to characterize the possible parameters involved in altering the estrous cycle, caecum and ovarian samples were collected to analyze pro- or anti-inflammatory cytokines *IL-1 β* and *IL-10* encoding genes by real-time PCR. The *IL-1 β* expression showed up-regulated in both caecum and ovary from dysbiotic animals when compared to control animals. On the other hand, *IL-10* showed down-regulated on the in at dysbiotic group samples when compared to the control group. In conclusion, the results indicated that the use of amoxicillin induces intestinal bacterial dysbiosis influencing the murine estrous cycle and a pro-inflammatory pattern in caecum and ovaries of mice under that antibiotic treatment.

Key-words: Interleukins, penicillin, antibiotics, *IL-1 β* , *IL-10*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estruturas químicas da amoxicilina anidra (a), amoxicilina sódica (b) e amoxicilina tri-hidratada (c).....	22
Figura 2.	Perfil de secreção de LH, FSH, prolactina, estradiol e progesterona durante o ciclo estral de roedores.....	28
Figura 3.	Representação do eixo hipotálamo hipofisário gonadal.....	29
Figura 4.	Fotomicrográfica da citologia vaginal e imagem representativa da proporção relativa dos tipos celulares presentes em cada fase do ciclo estral de camundongos. A: Proestro, B: Estro, C: Metaestro, D: Diestro, E: Proporção dos quatro estágios do ciclo (cor verde representa os leucócitos, cor laranja as células epiteliais nucleadas e em roxo células epiteliais cornificadas).....	30
Figura 5.	Fluxograma representativo do preparo e sequenciamento por <i>metabarcoding</i>	35
Figura 6.	Abundância relativa dos filos bacterianos dos animais tratados com amoxicilina ou PBS.....	38
Figura 7.	Abundância relativa de grupos bacterianos presentes em fezes de animais em disbiose induzida pela amoxicilina (azul), quando comparados com animais sem disbiose intestinal (vermelho).....	40
Figura 8.	Abundância relativa dos 100 principais gêneros dos grupos bacterianos presentes em fezes de animais em disbiose induzida pela amoxicilina (amarelo), quando comparados com animais sem disbiose intestinal (vermelho).....	41
Figura 9.	A disbiose intestinal induzida pela amoxicilina não influência na sobrevivência dos animais.....	42
Figura 10.	Contagem diferencial dos leucócitos circulantes presentes nas amostras de sangue dos camundongos disbióticos (colunas pretas) e não disbióticos (colunas brancas).....	43
Figura 11.	Caracterização do ciclo estral murino pelas análises de visualização vaginal (A), citometria de fluxo (B) e citologia vaginal (C).....	45
Figura 12.	A disbiose intestinal induzida por amoxicilina altera o ciclo estral	

	murino.....	47
	Alteração do número absoluto de células presentes nas fases de	
Figura 13.	proestro ou diestro em animais tratados com amoxicilina.....	48
	O tratamento contínuo com amoxicilina acarreta em ganho de peso	
Figura 14.	corporal de camundongos.....	49
	A disbiose intestinal causada pela amoxicilina aumenta a	
Figura 15.	expressão do gene <i>IL-1β</i> e diminui da <i>IL-10</i> no ovário e no ceco	
	dos camundongos.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos iniciadores das interleucinas para ensaios de PCR em tempo real.....	36
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AAD – Diarreia associada a antibióticos

AMH – Hormônio Anti-Mulleriano

ANOVA – Análise de variância

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

cAMP – Monofosfato cíclico de adenosina

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DII – Doença inflamatória intestinal

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Anticoagulante etileonodiamino tetra-acético

FSH – Hormônio folículo-estimulante

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina

IFAH – Federação Internacional de Saúde Animal da Europa

IFN- γ – Interferon gama

IL-1 β – Interleucina um beta

IL-2 – Interleucina dois

IL-6 – Interleucina seis

IL-8 – Interleucina oito

IL-10 – Interleucina dez

IL-12 – Interleucina doze

IL-17 – Interleucina dezessete

IL-18 – Interleucina dezoito

LIDIC – Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas e Crônicas

LH – Hormônio luteinizante

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mg – Miligramas

MG – Minas Gerais

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

mL – Mililitros

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

NK – Células assassinas naturais.

OTUs – Unidades taxonômicas operacionais

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos

PBS – Salina tamponada de fosfato

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PRRs – Receptor de reconhecimento de padrões

qPCR – PCR quantitativo ou PCR em tempo real

RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase Precedida de Transcrição Reversa

RENAME – Lista Brasileira de Medicamentos

RNA – Ácido ribonucleico

SCFA – Ácido graxo de cadeia curta

SIBO – Supercrescimento intestinal do intestino delgado

SRIS – Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

T.M.F – Transplante de Microbiota Fecal

TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta

TGI – Trato gastrointestinal

Th1 – Linfócito T *helper* um ou T auxiliar um

Th17 – Linfócito T *helper* dezessete ou T auxiliar dezessete

TNF α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

U – Unidade

UFC – Unidade formadora de colônias

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

μ g – Micrograma

μ L – Microlitros

UNIFAL – Universidade Federal de Alfenas

UNIFENAS – Universidade José do Rosário Vellano

USA – Estados Unidos da América

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO	18
2.1 Microbiota intestinal	15
2.2 Disbiose e disbiose induzida por antibacterianos	20
2.3 O uso de amoxicilina na saúde animal	22
2.3.1 A Amoxicilina tri-hidratada	23
2.3.2 Uso de antibióticos em animais	24
2.4 Disbiose e efeitos imunológicos	25
2.5 O ciclo estral de camundongos	27
3. JUSTIFICATIVA	32
4. OBJETIVO	33
4.1 Objetivo geral	33
4.2 Objetivos específicos	33
5. MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1 Modelo animal	34
5.2 Grupos experimentais e o tratamento com amoxicilina	34
5.3 Caracterização do ciclo estral murino	34
5.3.1 Método visual	34
5.3.2 Citometria de fluxo e citologia vaginal	35
5.4 Pesagem e coleta das amostras (fezes, sangue e órgãos)	35
5.5 Extração de DNA e identificação da microbiota por <i>metabarcoding</i>	36
5.6 Extração de RNA e análise da expressão diferencial de genes por PCR em tempo real	37
5.7 Leucograma	37
5.8 Análise estatística	38
6. RESULTADOS	39
6.1 O uso contínuo de amoxicilina acarreta a disbiose intestinal murina	39
6.2 A disbiose induzida pela amoxicilina não altera a sobrevivência de camundongos nem a contagem diferencial de leucócitos circulantes	43
6.3 A disbiose intestinal induzida pela amoxicilina altera o ciclo estral dos camundongos, aumenta o peso dos animais e diminui o número absoluto de células na citologia vaginal	44

6.4 A disbiose intestinal causada pela amoxicilina altera o estado pró-inflamatório do ovário e do ceco de camundongos.....	50
7. DISCUSSÃO	52
8. CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXOS	65
Anexo I - Certificado de aprovação CEUA/UNIFENAS	66

1. INTRODUÇÃO

O corpo humano hospeda trilhões de micro-organismos em nível das membranas cutâneas e mucosas. Juntos, eles constroem uma comunidade microbiana complexa, com múltiplas funções metabólicas e imunológicas que são essenciais para a sobrevivência do organismo (LIN E ZHANG, 2017). A representação mais importante dessa comunidade pode ser encontrada no intestino como a microbiota intestinal (IACOB et al., 2019).

A microbiota gastrointestinal consiste em um grupo de micro-organismos que habitam o trato digestório. Estes compreendem um ecossistema metabolicamente ativo e complexo, consistindo em centenas de milhares de micro-organismos (bactérias, vírus e fungos) que colonizam o trato digestório logo após o nascimento do indivíduo. A microbiota intestinal estabeleceu uma associação dinâmica de benefícios mútuos (simbiose) com o organismo humano, o qual resulta na manutenção de padrões imunológicos, metabólicos, bem como na correta digestão de nutrientes e em a sua absorção (PASSOS; MORAES-FILHO, 2017).

Os seres vivos têm seu próprio padrão individual de distribuição de microbiota e composição, que é em parte determinada pelo genótipo do hospedeiro e pela colonização inicial que ocorre imediatamente após o nascimento e pós-hábitos de vida do indivíduo. Diferentes fatores, como o tipo de entrega e aleitamento materno, estilo de vida, dieta, condições higiênicas e ambientais, uso de antibióticos e vacinação podem determinar mudanças definitivas no padrão da microbiota intestinal (PASSOS; MORAES-FILHO, 2017).

A microbiota intestinal de murinos consiste em uma diversidade de micro-organismos com alta variabilidade, composta por filos bacterianos como Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacterias, Cyanobacterias e demais seres microbianos como vírus e fungos (BEHR et al., 2018). O ceco de camundongos é enriquecido em espécies das famílias Ruminococcaceae e Lachnospiraceae, enquanto o cólon possui membros das famílias Bacteroidaceae e Prevotellaceae. Espécies da família Rikenellaceae são proeminentes tanto no ceco como no cólon (DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2016).

A ruptura na cooperação entre hospedeiro e sua microbiota pode gerar consequências para a saúde do hospedeiro, com a diminuição ou modificação da composição microbiana, podendo culminar em condições patológicas tanto em nível

intestinal como extraintestinal (ALMADA; ALMADA E MARTINEZ, 2015). Sendo assim, utilizar o termo disbiose é inútil se for apenas para descrever uma mudança na microbiota, a qual é assumida como sendo prejudicial para o hospedeiro. Em alguns casos, a microbiota pode alterar-se numa resposta adequada, favorecendo o hospedeiro, ou representar fenômenos sem implicações fisiopatológicas (TAGUER & MAURICE, 2016).

A disbiose intestinal é equacionada por diversos fatores que podem modificar a microbiota intestinal, como a dieta, o ambiente, o estresse e até o uso de fármacos, como os antibióticos (BEHR et al., 2018). Os antibióticos estão entre as mais importantes descobertas da medicina moderna (TORTORA et al., 2017). A penicilina, por exemplo, que foi o primeiro antibiótico a ser descoberto e utilizado (não se considerando as sulfas), é um inibidor da síntese de parede celular de moderado espectro (TORTORA et al., 2017; MARCO et al., 2017).

Entre os eventos críticos para a manutenção de um determinado genótipo ou de uma espécie, a função reprodutiva feminina é determinante, sendo o processo de crescimento e maturação dos folículos ovarianos, a ovulação e o ciclo de vida do corpo lúteo de extrema importância. Essa série coordenada de eventos, conhecida na maioria dos mamíferos como ciclo estral, é caracterizada por quatro fases (proestro, estro, metaestro e diestro), e está sob o controle muito preciso de uma série de variações hormonais (FSH, LH, progesterona, estradiol), determinado tanto por fatores intrínsecos como por extrínsecos ao indivíduo (CALLEGARI, 2008).

Embora um grande número de estudos sobre as influências da disbiose venham sendo publicados nas últimas décadas, poucos trabalhos delimitam os reais mecanismos que coordenam a função reprodutiva e os efeitos adversos de fármacos, como o uso de antibióticos em animais (CALLEGARI, 2008). Logo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a disbiose intestinal induzida pela amoxicilina e sua influência sobre o ciclo estral de camundongos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Microbiota intestinal

O termo microbiota intestinal é utilizado para designar o conjunto de micro-organismos presentes nos intestinos (ISOLAURI; SALMINEN; OUWEHAND, 2004). Além disso, estudos indicam que a microbiota intestinal trata-se de uma mistura dinâmica desses micro-organismos, cuja composição varia ao longo do trato gastrointestinal (BEHR et al., 2018).

Considera-se que os mamíferos se desenvolvem em um ambiente livre de bactérias dentro do útero da mãe, contudo, durante o nascimento, pela passagem no canal vaginal densamente povoado por micro-organismos e, durante um período de desenvolvimento inicial, se alimentam exclusivamente do leite materno (BOURLIOUX et al., 2003), a microbiota colonizadora é “moldada” pelos componentes dietéticos e imunológicos desse leite, que inclui a imunoglobulina A (IgA) derivada da mãe, e segue um processo de desenvolvimento que é caracterizado pela colonização por espécies de micro-organismos (fungos, vírus e bactérias) ao longo da idade (NABHANI et al., 2019). A microbiota materna e demais fatores como tipo do parto, idade, dieta, ambiente, utilização de probióticos e prebióticos, tratamentos farmacológicos, tolerância oral, interações intermicrobianas e interações micro-organismo-hospedeiro podem influenciar na conformação do ecossistema da microbiota do indivíduo (PANTOJA-FELICIANO et al., 2013).

Vale ressaltar que a microbiota contribui diretamente para a metabolização de nutrientes e de vitaminas essenciais para a viabilidade do hospedeiro, colaborando para obter energia de alimentos. Essa energia é adquirida especialmente por meio da fermentação de carboidratos não absorvíveis, em uma reação que induz a produção de cadeia curta de ácidos graxos (SCFA), de hidrogênio e de dióxido de carbono (PASSOS; MORAES-FILHO, 2017). Além disso, a microbiota se estabelece de duas formas: autóctone e alóctone. A autóctone refere-se à microbiota residente, a qual tem um papel importante na manutenção da integridade do hospedeiro, quando em equilíbrio em um sítio específico (MACKIE et al., 1999). Essa microbiota não induz doença em condições de normalidade (NICOLI, 2004; SWIDSINSKI et al., 2005). Somente as bactérias dominantes poderão assumir as funções descritas anteriormente (entre 10^9 e 10^{11} UFC/g) e

subdominantes (10^6 e 10^8 UFC/g) presentes em número suficiente para causar impacto no hospedeiro. Já a microbiota alóctone, é transitória, caracterizada pela presença de micro-organismos potencialmente patogênicos (MOURÃO et al., 2005). Em desequilíbrio, esses micro-organismos podem proliferar e provocar doenças (MACKIE et al., 1999). As populações microbianas não residentes ou transientes se encontram abaixo de 10^6 UFC/g, sendo incapazes de desempenhar algum impacto no hospedeiro mamífero (PEREZ et al., 2014).

O intestino dos mamíferos abriga uma das comunidades mais densas de bactérias no planeta Terra, cujo número excede o de células eucarióticas que compõem seu hospedeiro (IACOB et al., 2019). Propõe-se que a microbiota intestinal se comporte como um organismo, produzindo componentes e metabólitos microbianos que estão envolvidos em muitos processos do hospedeiro animal (NABHANI et al., 2019).

Trilhões de micro-organismos compõem a microbiota intestinal humana, em que técnicas moleculares demonstraram que a microbiota apresenta-se composta por 99,1% de espécies bacterianas representadas principalmente pelos filos Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria, pertencentes principalmente à família Enterobacteriaceae (Gram-negativa) ou aos gêneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Clostridium* e *Enterobacter*, sendo o restante da microbiota intestinal composta por vírus ou por membros do domínio Archaea ou Eukarya (IACOB et al., 2019).

A microbiota bacteriana do intestino delgado de roedores é caracterizada predominantemente por espécies do gênero *Streptococcus*, *Veillonella* e *Lactobacillus*, enquanto no intestino grosso e intestino distal as espécies anaeróbias, principalmente dos gêneros *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium* e *Bifidobacterium* são identificadas, além de espécies anaeróbicas facultativas como as pertencentes aos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus* e *Proteus* (DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2016). Em camundongos, a microbiota fecal é inicialmente dominada por Proteobacteria, uma assinatura do intestino delgado, mas, após o desmame, as espécies dominantes tornam-se *Clostridium* e *Bacteroides* spp., que são características do ceco. O desenvolvimento sequencial da microbiota pode, assim, ocorrer de compartimentos proximais a distais, o que faz sentido, já que a dispersão no intestino é em grande parte unidirecional ao longo da corrente fecal (LEE et al., 2013).

2.2 Disbiose e disbiose induzida por antibacterianos

O distúrbio intestinal da microbiota, conhecido como disbiose intestinal, ocorre devido a uma diminuição ou a um aumento exacerbado de micro-organismos presentes nesta microbiota do intestino (ZARRINPAR et al., 2018).

A microbiota intestinal pode ser considerada como chave na regulação de eventos fisiológicos e no desenvolvimento de distúrbios intestinais como a enterocolite necrosante e a doença intestinal inflamatória (DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2006). As alterações na microbiota intestinal contribuem para a etiologia do diabetes, da asma, da autoimunidade e do câncer (PAIXÃO; CASTRO, 2016). Consequentemente, muito esforço tem sido dedicado a compreender os fatores que influenciam a composição da microbiota intestinal para manter e/ou restaurar a saúde no organismo do hospedeiro (HUANG et al., 2015). Segundo Butel 2013, o trato gastrointestinal (TGI) é constituído por complexas interações de células, de nutrientes da dieta e de micro-organismos colonizadores, o que garante a homeostasia intestinal e um equilíbrio dinâmico que favorece a saúde do hospedeiro (BUTEL, 2013).

As circunstâncias que originam as causas do termo disbiose intestinal são diversas, como dieta, estado do hospedeiro, exposição a substâncias químicas, a ambiente e utilização de fármacos, como por exemplo, o uso de antibióticos (ZHANG et al., 2015; ROSENFELD, 2017; BEHR et al., 2018).

A disbiose é caracterizada por um estado de microbiota alternativo no qual subgrupos de células T, Th1, Th2, Treg e $\gamma\delta$ T, de células da imunidade inata e metabólitos como ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), anticorpos (especialmente IgA) e citocinas são alterados (ROSA et al., 2018). Todos esses mediadores do hospedeiro promovem a comunicação entre o TGI e os órgãos extra-intestinais. Isso significa que quaisquer mudanças na interação da microbiota do TGI têm repercursões na homeostase do corpo humano (PETERSON et al., 2015; IZUMI et al., 2016; ROSA et al., 2018).

Em uma revisão de Rosa et al., 2018 e Zarrinpar et al., 2018, as evidências atuais sugerem que o *crosstalk* entre a microbiota comensal tem influência na homeostase do corpo humano e animal, levando a um estado saudável ou doente (ROSA et al., 2018; ZARRINPAR et al., 2018). Já foi demonstrado que a disbiose intestinal pode induzir transtornos psiquiátricos (BERCIK, COLLINS, 2014),

autismo (GHAISAS, MAHER, 2015), supercrescimento intestinal do intestino delgado (SIBO) (GHOSHAL, 2017); diabetes tipo I (BROWN et al., 2015); gastroenterite (LANGE et al., 2016); doença hepática (LEUNG, YIMLAMAI, 2017); colangite esclerosante associada à nutrição parental (YANG et al., 2016); obesidade (RILEY et al., 2013); diarreia associada a antibióticos (AAD) (KABBANI et al., 2017); acidente vascular cerebral isquêmico (BENAKIS et al., 2016); doença de Parkinson (PARASHAR, UDAYABANU, 2017); asma (ARRIETA, FINLAY, 2014); colite associada ao uso de antibióticos (PETERSON et al., 2015); favorecimento da infecção por *Clostridium difficile* (CERVANTES, 2016); esclerose múltipla (LEUNG, YIMLAMAI, 2017); enterocolite necrosante (CASSIR et al., 2016); doença inflamatória intestinal (LANGE et al., 2016); câncer de fígado (YANG et al., 2016); câncer colorretal (DIK et al., 2016); sepse (KREZALEK et al., 2016). Embora as pesquisas tenham destacado principalmente resultados ruins entre modelos de roedores e estudos epidemiológicos, há novas evidências sobre a modelagem da microbiota para fins de tratamento, principalmente nas doenças de Parkinson (PARASHAR, UDAYABANU, 2017), de diarreia associada a antibióticos (AAD) (KABBANI et al., 2017) e de supercrescimento intestinal do intestino delgado SIBO (SCALDAFERRI et al., 2012) (ROSA et al., 2018; ZARRINPAR et al., 2018).

Devido a fins médicos e muitas vezes nas afecções nos animais para o consumo humano, a microbiota intestinal está exposta à ação de antibióticos (FRANCINO, 2016). A exposição a esses antimicrobianos pode alterar a microbiota, causando, por exemplo, a seleção de agentes patogênicos oportunistas resistentes que podem causar doenças e afetar a saúde (BULL e PLUMMER, 2014; FRANCINO, 2016).

Antibióticos de amplo espectro podem afetar a abundância em 30% das bactérias na comunidade intestinal, levando a um *déficit* na composição, na diversidade e na uniformidade taxonômica dos grupos bacterianos residentes (FRANCINO, 2016). Quando interrompida a terapia com um antibiótico, pode haver certo grau de resiliência na microbiota, sendo capaz de restaurar a composição similar à original, mas o estado inicial nem sempre é recuperado (PINTO, 2016). Essas alterações contribuem para o risco imediato a infecções e também podem afetar a homeostase imunológica básica, além de enriquecer a microbiota com micro-organismos resistentes ao antibacteriano utilizado (PINTO, 2016). Como exemplos, o uso da cefotaxima em Ratos *Wistar* demonstrou alterações na

microbiota intestinal, caracterizadas por uma menor diversidade de α -proteobactérias, com aumento das famílias *Bifidobacteriaceae* e *Enterococcaceae*, além de baixo nível de valerato - um AGCC (Ácidos graxos de cadeia curta) - encontrado, culminando com a ruptura da homeostase intestinal (TULSTRUP et al., 2015).

No caso da vancomicina, estudos em roedores apresentaram uma diversidade de alterações na homeostase do hospedeiro. Os animais expostos à vancomicina tiveram um ceco mais pesado e uma elevação do pH em relação aos animais não tratados com o antibiótico, além de mudança na comunidade bacteriana no ceco, no íleo e nas fezes (ROSA et al., 2018). Notavelmente, a carga bacteriana anaeróbica se apresentou aumentada com menores diversidades de α e β -proteobactérias, diminuição de bactérias do filo Firmicutes e um aumento em de Proteobacteria e *Verrucomicrobiaceae*. Além disso, a permeabilidade intestinal foi diminuída (CHENG et al., 2017).

2.3 O uso de amoxicilina na saúde animal

Em 1928, Alexander Fleming, um médico pesquisador inglês, recém-chegado da primeira Guerra Mundial descobriu, enquanto estudava em seu laboratório de pesquisa na Universidade St. Mary's em Londres, variedades de *Shaphylococcus aureus* (MARCO et al., 2017). Fleming observou uma zona de inibição formada em torno de um fungo que estava contaminando suas culturas. A substância antibacteriana foi denominada penicilina, uma vez que foi produzida pelo fungo do gênero *Penicillium* (WILLIAMS e LEMKE, 2013).

As penicilinas são classificadas em várias subcategorias, sendo diferenciadas pelas estruturas químicas e atividades antimicrobianas (KAUR et al., 2011). A amoxicilina, que pertence à subcategoria de aminopenicilinas, foi sintetizada em 1964 pela introdução de um grupo p-hidroxila na cadeia lateral da ampicilina, que é uma outra aminopenicilina. Dessa forma, a absorção oral foi melhorada e os efeitos colaterais, como a diarreia, foram minimizados, em comparação com a ampicilina (MARCO et al., 2017).

A amoxicilina está disponível em três formulações diferentes: anidra, sódica e tri-hidratada (Figura 1).

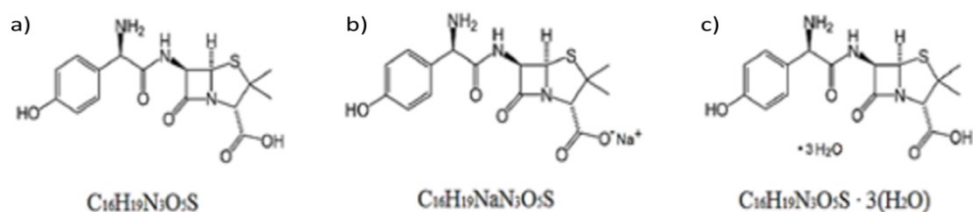


Figura 1. Estruturas químicas da amoxicilina anidra (a), amoxicilina sódica (b) e amoxicilina tri-hidratada (c). Fonte: Adptado de MARCO et al., 2017.

2.3.1 A Amoxicilina tri-hidratada

A amoxicilina tri-hidratada é um antibiótico de moderado espectro indicado para o tratamento de infecções contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Como todos os antibióticos β -lactâmicos, como a amoxicilina tri-hidratada, esses fármacos possuem funções bactericidas ao interferir na biossíntese do peptidoglicano, um dos constituintes da parede celular bacteriana, uma vez que essa estrutura é necessária para a manutenção da integridade celular, entre outros processos vitais (KAUR et al., 2011). O peptidoglicano é composto de dois açúcares alternados (N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico) e um peptídeo de cinco aminoácidos que termina em D-Alanil-D-alanina, que está ligado ao ácido N-acetilmurâmico. Esse polímero fornece estabilidade mecânica rígida devido à sua estrutura altamente reticulada (PETRI, 2006).

A amoxicilina liga-se à proteína ligadora de penicilina 1A (PBP-1A), que está localizada na membrana celular; é inativa à transpeptidas e sensível à penicilina pela acilação de seu domínio C-terminal. Essa interação é possível porque a amoxicilina tem uma estrutura semelhante à de D-alanil-D-alanina, o substrato original dessa enzima (BRAZIL, 2016). Essa inibição enzimática ocorre no último passo da síntese da parede celular bacteriana, impedindo, assim, a interligação de duas cadeias de peptidoglicano. A desestabilização estrutural da parede celular leva à formação de esferoplastos e à rápida ocorrência de enzimas autolíticas mediadas por lise (MARCO et al., 2017).

A amoxicilina tri-hidratada é indicada para o tratamento de infecções por bactérias Gram-positivas aeróbicas e anaeróbicas facultativas como *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus aureus*, sensível à penicilina, espécies de *Corynebacterium*, *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes*; bactérias anaeróbicas

como espécies do gênero *Clostridium* e bactérias Gram-negativas aeróbicas e anaeróbios facultativos, como *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, espécies do gênero *Salmonella*, *Shigella* e *Brucella*, *Bordetella pertussis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pasteurella septica*, *Vibrio cholerae* e *Helicobacter pylori* (MARCO et al., 2017). A amoxicilina é suscetível à degradação por β -lactamases e, portanto, o espectro de atividade de amoxicilina tri-hidratada não abrange os micro-organismos que produzem essas enzimas, ou seja, não inclui *Staphylococcus* spp., resistentes nem todas as cepas de *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. (KATZUNG, TREVOR, 2017).

2.3.2 Uso de antibióticos em animais

Os antibióticos são amplamente utilizados no contexto da Medicina Veterinária. Segundo a *International Federation for Animal Health Europe* (IFAH), em 2010, os antimicrobianos corresponderam a uma quota de mercado dos medicamentos veterinários de 14,19% na Europa (IFAH, 2012). Já em Portugal, essa quota sobe para 33.3% (APIFARMA, 2011). De acordo com a IFAH, as tetraciclinas são a classe de antibióticos mais utilizada nos animais, seguidas de penicilinas, sulfonamidas, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e cefalosporinas (IFAH, 2010). Já no Brasil, a FDA (*Food and Drug Administration*) publicou no Sumário de Antimicrobianos para uso em animais (2010) que cerca de 1% dos antibióticos utilizados no Brasil são utilizados em animais, sendo que 42% são da classe das tetraciclinas; 8%, das penicilinas; 5%, das macrolídeos; 0,2%, cefalosporinas; 0,1%, fluoroquinolonas e 44,7% pertencentes a outros antibacterianos (FDA, 2010).

A fim de controlar e combater doenças infecciosas, Radostits et al., 2006, relatou que a amoxicilina é um dos antibióticos mais utilizados no tratamento de pneumonia e de broncopneumonia, principalmente para combate inicial contra pneumonia em bezerros pré-desmamados, sendo amplamente utilizada na prática veterinária (RADOSTITS et al., 2006). Além disso, a amoxicilina tri-hidratada é indicada no tratamento de muitas doenças bacterianas em bovinos, sendo usual frente à pneumonia bacteriana, a doenças diarreicas, à mastite e a doenças do casco (MAZUREK; BOK; CHUDZIK, 2018).

Além do combate a doenças infecciosas, os antibióticos são empregados visando medidas profiláticas na reprodução animal. Morrell et al., 2019, enfatizam a importância da utilização de antibióticos no preparo de sêmen de javali para a inseminação artificial, a fim de prevenir a contaminação por bactérias tanto no procedimento de coleta do ejaculado, quanto pelo meio em que o sêmen será armazenado por vários dias, já que é rico em nutrientes, podendo, assim, haver a replicação das bactérias e, conseqüentemente, a contaminação do sêmen (MORRELL et al., 2019).

A antibioticoterapia também é amplamente utilizada na produção animal com o objetivo de ganho de peso. Estudos em suínos tratados com o antibiótico macrolídeo (tilosina) mostraram aumentos rápidos na abundância relativa de filo Firmicutes, sendo esse filo associado positivamente à microbiota intestinal com o ganho de peso no hospedeiro (KIM et al., 2016). Lee et al., 2012, também descrevem que os antibióticos utilizados em frangos encontrados em ambientes poluídos mostram-se úteis nas taxas de crescimento e no controle de infecções patogênicas, levando-os a melhor produção e qualidade de vida (LEE et al., 2012). Na piscicultura, Santos (2018) revela que o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) aprovou apenas dois princípios ativos em antibacterianos, o florfenicol (Aquaflor®) e a oxitetraciclina (TM 700®). Ambos os princípios liberados são comumente empregados na criação de tilápias por terem vantagens como a alta eficácia no controle de bactérias e baixo custo de aquisição; ainda, foi relatado pelo autor que o uso de florfenicol é mais eficaz, pela economia durante o período de recria, pela diminuição dos custos variáveis, o que gera maior taxa de sobrevivência e possibilidades maiores de vendas (SANTOS, 2018).

Assim, o uso de antibioticoterapia na ciência animal é amplo, buscando não só o combate a infecções mas também a profilaxia e a produção animal. Assim, é de suma importância entender os mecanismos de influência no uso dos antibióticos para a melhor determinação dos efeitos no animal.

2.4 Disbiose e efeitos imunológicos

A defesa contra micro-organismos é mediada pelas reações iniciais da imunidade inata e pelas respostas tardias da imunidade adaptativa. A imunidade inata é a primeira linha de defesa, pois possui mecanismos celulares e bioquímicos

envolvidos no controle da homeostasia, prevenindo o processo infeccioso (CRUVINEL et al., 2010). Os mecanismos da imunidade inata são específicos para as estruturas comuns a grupos de micro-organismos relacionados, conhecidos como PAMPs (Padrões moleculares associados aos patógenos), que são reconhecidos por receptores desses padrões PRRs (Receptores de reconhecimento de padrões). A partir desse reconhecimento, citocinas são secretadas com o objetivo de estimular uma resposta imune adaptativa específica mediada por linfócitos e anticorpos (WALPORT et al., 2014).

A secreção das citocinas é um evento breve e autolimitado; são frequentemente pleiotrópicas e redundantes, podendo assim influenciar o perfil de resposta imune pró ou anti-inflamatório (JÚNIOR-MESQUITA et al., 2010). As citocinas iniciam suas ações pela ligação a receptores de membrana específicos nas células-alvo. As respostas celulares às citocinas são firmemente reguladas, sendo que existem mecanismos inibidores por *feedback* para diminuir estas respostas (CRUVINEL et al., 2010).

A IL-1 é primariamente produzida por macrófagos e monócitos, assim como por células não imunológicas, tais como fibroblastos e células endoteliais ativadas durante uma lesão celular ou uma infecção. Há dois tipos conhecidos: IL-1 α e IL-1 β (OLIVEIRA et al., 2011). A IL-1 α é uma interleucina pró-inflamatória, intracelular, marcadamente associada a membranas celulares que age por meio de contatos celulares (OLIVEIRA et al., 2011), constitutivamente expressa em muitos tipos de células em tecidos saudáveis no estado estacionário. Sua expressão pode ser aumentada em resposta a fatores de crescimento e a estímulos pró-inflamatórios ou associados ao estresse (DI-PAOLO; SHAYAKHMETOV, 2016).

A IL-1 β é sintetizada como uma proteína precursora (Pro-IL-1 β), que não é secretada na forma ativa até ser metabolizada pela enzima caspase-1 frente à ativação de receptores citosólicos denominados inflamassomas (GAIDT e HORNUNG, 2017). Ao ser secretada, a IL-1 β induz febre, síntese de proteínas plasmáticas de fase aguda, estimulação da produção de neutrófilos, plaquetas e mediadores de inflamação local, produção de óxido nítrico e moléculas de adesão endotelial (OLIVEIRA et al., 2011). A IL-1 β também tem importante função no desenvolvimento e na manutenção da dor (LIMA e FRANCO, 2010). A presença da citocina pró-inflamatória IL-1 β está associada a uma variedade de padrões inflamatórios intestinais quando a microbiota intestinal está alterada como, por

exemplo, na colite tanto em humanos quanto em camundongos (SINGH et al., 2019).

Entre as células que fazem parte dos mecanismos reguladores na mucosa intestinal, as células T com fenótipo CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (células T reguladoras) contribuem para a homeostase intestinal, cuja e sua deficiência (número/função) está associada ao desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas. As células T reguladoras constituem uma fonte importante da citocina anti-inflamatória IL-10 e estão envolvidas na regulação da resposta imune de forma geral, na supressão de células T autorreativas e na manutenção da tolerância imunológica periférica (CORSETTI et al., 2013).

O efeito principal da IL-10 é inibir a síntese de outras citocinas, como o IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- α . A IL-10 inibe também a proliferação de células Th1 mas atua como coestimulador no crescimento dos tímócitos imaturos, agindo como fator de diferenciação para as células T citotóxicas, sendo esta ação de menos intensidade (WALPORT et al., 2014). Além disso, a IL-10 também está relacionada ao equilíbrio e regulação do perfil inflamatório intestinal. Singh e colaboradores (2019) demonstraram que a desregulação da via de inibição mediada pela IL-10 está associada a intervenções nutricionais em murinos, podem exacerbar a doença inflamatória intestinal (SINGH, et al., 2019).

2.5 O ciclo estral de camundongos

O estro significa comportamentos de acasalamentos que acompanham a ovulação na maioria dos mamíferos do sexo feminino. Esse termo tem origem grega *oistro*, derivada do latim *oestrus*, definido como um “frenesi”, “desejo brutal” e/ou vontade sexual (VILELA et al., 2007).

A maturidade sexual de camundongos ocorre por volta de 50 a 60 dias nas fêmeas e aproximadamente em 50 dias nos machos. A duração da gravidez é de 19 a 21 dias, culminando no nascimento de aproximadamente dez a doze filhotes em média. O tamanho da ninhada pode variar entre as diferentes linhagens e de acordo com a idade das fêmeas.

As fêmeas de camundongos são poliétricas, com ciclo de 4 a 5 dias e cio de 9 a 20 horas. A ovulação espontânea ocorre entre 8 e 11 horas após o início do cio e a ovulação pós-parto ocorre em 14 a 28 horas após a parição. Caso não haja

fecundação pós-parto, a fêmea apenas retornará ao seu ciclo normal alguns dias após o desmame dos filhotes.

Em roedores o ciclo estral completo acontece de quatro a cinco dias, ou seja, a cada cinco dias ocorre a ovulação, dividindo-se em proestro, estro, metaestro e diestro (Figura 2). O proestro começa com a fase folicular do ovário, que culmina no estro (cio). O metaestro e diestro caracterizam-se pela fase luteínica do ovário. Quando agrupadas, porém, as fêmeas podem permanecer em anestro (ausência de ciclo estral) continuamente até que sejam expostas a um macho. A partir desse momento o estro retorna no prazo de até 48 horas, sendo que a este fenômeno dá-se o nome de “efeito de Whitten” (CHORILLI, MICHELIN, SALGADO, 2007).

Os eventos que ocorrem durante o ciclo estral são regulados basicamente pela interação dos hormônios GnRH (hormônio liberador das gonadotrofinas), FSH (hormônio folículo estimulante), LH (hormônio luteinizante), estradiol e progesterona. O GnRH é produzido pelo hipotálamo, localizado na base do cérebro, e regula a liberação das gonadotrofinas FSH e LH. O FSH e o LH, produzidos pela hipófise anterior (glândula pituitária), são responsáveis pelo desenvolvimento folicular e ovulação. Os hormônios estradiol e progesterona são produzidos pelas estruturas do ovário (folículo e corpo lúteo, respectivamente) e estão ligados à manifestação do cio e manutenção da gestação (EMANUELE et al., 2002).

Já é bem descrito o perfil de secreção das gonadotrofinas, estradiol, progesterona e prolactina durante o ciclo estral (FREEMAN, 1994). A concentração plasmática de LH durante o ciclo estral é mais baixa na madrugada do estro, imediatamente após a ovulação e permanece baixa durante o metaestro e o diestro, até o início da tarde do próximo proestro. Então, por volta das 15h:00min, ela aumenta rapidamente para um pico ao redor das 17h:00min – 18h00min que induz à ovulação cerca de 8 horas depois. Após o pico, a concentração LH reduz rapidamente até alcançar os seus valores basais na madrugada do estro (CALLEGARI, 2008).

O padrão de secreção do FSH no ciclo estral é semelhante ao do LH. Após o pico pré-ovulatório, a concentração de FSH diminui rapidamente, mas, diferentemente do LH, há um pico secundário ao redor das 3 horas da madrugada do estro. Então a concentração começa a cair até atingir valores basais ao final da tarde do estro (SMITH, FREEMAN, NEIL, 1975; CALLEGARI, 2008).

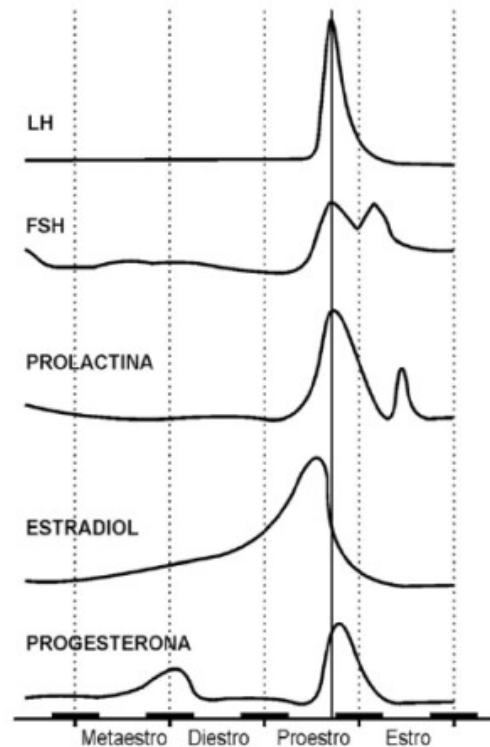


Figura 2. Perfil de secreção de LH, FSH, prolactina, estradiol e progesterona durante o ciclo estral de roedores. Fonte: Adaptado de ANSELMO-FRANCI, SZAWKA, 2005; CALLEGARI, 2008.

Os ovários são a principal fonte de estrógeno circulante. O principal produto secretório é o estradiol, sintetizado pelas células granulosas a partir de precursores androgênicos (androstenediona ou testosterona), proporcionados pelas células da teca (WILLIAMS; STANGEL, 1996; AMADEI, et al.; 2006).

Em roedores, o estradiol é liberado pelos ovários e tem ação inibitória sobre o eixo hipotálamo-hipófise durante a maior parte do ciclo estral (Figura 3). Entretanto, esta retroalimentação negativa é quebrada durante a fase folicular, quando o estradiol secretado abundantemente pelos folículos ovarianos passa a exercer ação estimuladora sobre o hipotálamo e a hipófise. A ação do estradiol ovariano leva a um aumento da secreção de GnRH por neurônios hipotalâmicos. Além disso, esse aumento provoca um pico de LH na fase do proestro. Em fêmeas de camundongos e de ratos (roedores noturnos), o horário do pico precede o início da atividade do animal. É no momento do pico que ocorre a expulsão do oócito do folículo ovariano. Assim, na ocorrência da cópula, os óvulos estarão depositados nas trompas uterinas à espera dos espermatozoides (POLETINI, 2012).

A progesterona apresenta um aumento de suas concentrações plasmáticas durante a tarde de proestro e o início do estro. Esse aumento ocorre

quase simultaneamente com o pico pré-ovulatório de LH, que atinge o pico juntamente com o do LH e retorna às concentrações basais na manhã do estro. Esse pico de progesterona é de origem folicular. Um segundo pico desse hormônio, de origem luteal, inicia-se ao meio-dia do metaestro, mantém-se na madrugada do diestro e diminui para concentrações basais no início da manhã desse dia (SMITH; FREEMAN; NEIL, 1975).

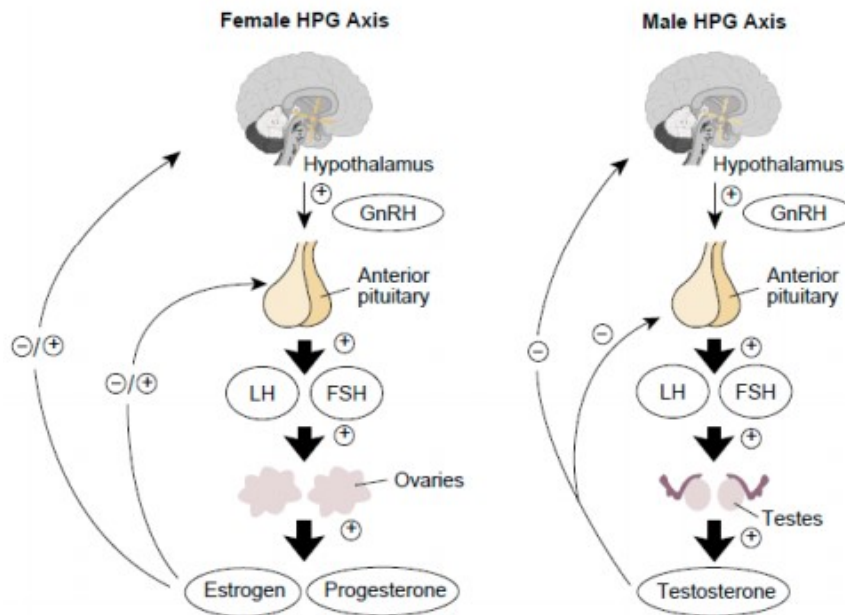


Figura 3. Representação do eixo hipotálamo hipofisário gonadal. Fonte: Adaptado de KONG et al., 2014.

Cada fase do ciclo estral é facilmente identificada pela análise do tipo de células que descama do epitélio vaginal, tecido altamente responsivo às variações da secreção de estradiol e de progesterona anteriormente descritas. No proestro, a duração é de 12 a 14 horas, na qual se observa um número abundante de células epiteliais nucleadas (Figura 4A; E), resultado da estratificação e da proliferação celular induzida pelos picos de estrógenos (estradiol) LH e FSH, cuja concentração atinge o máximo no final da manhã do proestro. No estro, os efeitos máximos das altas concentrações de estradiol apresentam-se pela corneificação celular observada na citologia vaginal desta fase (Figura 4B; E), com duração de 25 a 27 horas, ocorrendo o pico de secreção de LH que precede a ovulação no final. As fases seguintes são caracterizadas pela ação da progesterona; no metaestro, com 6 a 8 horas de duração, ainda persistem poucas células corneificadas e outras nucleadas, já acompanhadas por um grande número de leucócitos (Figura 4C; E).

No diestro, fase mais longa, 55 a 57 horas, na citologia vaginal, apresenta-se apenas um infiltrado leucocitário, sem células epiteliais (Figura 4D; E), consequências da ação da progesterona, bem como das baixas concentrações de estradiol presentes no estro e no metaestro (LONG, EVANS, 1922; CALLEGARI, 2008).

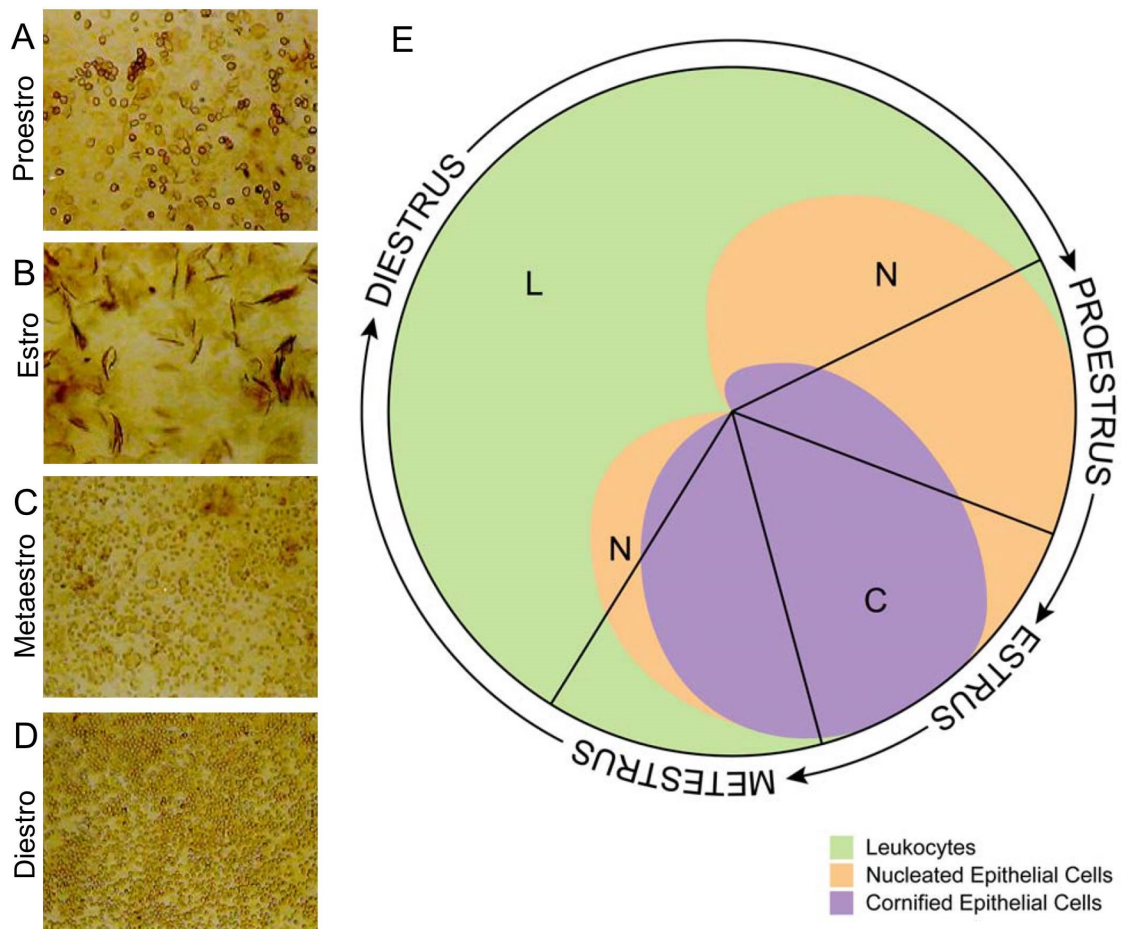


Figura 4. Fotomicrográfica da citologia vaginal e imagem representativa da proporção relativa dos tipos celulares presentes em cada fase do ciclo estral de camundongos. A: Proestro, B: Estro, C: Metaestro, D: Diestro, E: Proporção dos quatro estágios do ciclo (cor verde representa os leucócitos, cor laranja as células epiteliais nucleadas e em roxo células epiteliais cornificadas). Fonte: Adaptado de LONG, EVANS, 1922; CALLEGARI, 2008; BYERS et al., 2012.

3. JUSTIFICATIVA

O estudo da microbiota intestinal tem aumentado a atenção devido a sua associação com uma ampla gama de condições imunopatológicas, incluindo doenças metabólicas (por exemplo, obesidade, síndrome metabólica, diabetes *mellitus* tipo II), distúrbios autoimunes (por exemplo, diabetes *mellitus* tipo I, artrite reumatoide) câncer, alergias e distúrbios do desenvolvimento neurológico e comportamental (por exemplo, autismo, depressão, demência). Assim, no que diz respeito à microbiota, os camundongos fornecem modelos *in vivo* estimulantes para desvendar os mecanismos moleculares subjacentes às interações comensais entre bactérias e hospedeiros e seus determinantes em saúde e doença (KLITZING et al., 2017). Sendo assim, justifica-se, não só pela relevância do assunto, mas também pela inédita abordagem proposta neste trabalho estudar a influência da disbiose no ciclo estral para um melhor entendimento dos efeitos do uso de antibióticos nos parâmetros de interesse da reprodução animal.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da disbiose intestinal induzida pela amoxicilina no ciclo estral murino.

4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a composição da microbiota bacteriana intestinal murina frente ao tratamento pela amoxicilina ou pelo PBS.
- Avaliar os parâmetros de peso, de sobrevivência e de caracterização dos tipos celulares sanguíneos de camundongos frente ao tratamento pela amoxicilina ou pelo PBS.
- Determinar e caracterizar as alterações das fases do ciclo estral murino frente às alterações da microbiota intestinal induzida pela amoxicilina.
- Analisar a expressão diferencial de genes codificadores de citocinas *IL-1 β* ou *IL-10* no ovário e ceco de camundongos em situação de disbiose, causada pela amoxicilina.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Modelo animal

Os animais utilizados nesta pesquisa foram camundongos isogênicos fêmeas da linhagem 129/SvEv com 7 e/ou 8 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura, luz, limpeza, alimentação baseada em água e ração *ad libitum*. Os protocolos de experimentação foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIFENAS com parecer N° 06A/2018 (Anexo I).

5.2 Grupos experimentais e o tratamento com amoxicilina

Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais, utilizando 4 animais por grupo; grupo tratado com PBS (Controle) e tratado com amoxicilina (Amox), em que estes foram tratados com 500 mg/kg de amoxicilina tri-hidratada diluída em PBS estéril, administrados 100uL por gavagem oral durante 15 dias.

5.3 Caracterização do ciclo estral murino

A caracterização do ciclo estral foi realizada por três metodologias diferentes: Método visual, citometria de fluxo e citologia vaginal, sendo as técnicas realizadas próximo aos picos hormonais e das mudanças das fases do ciclo (9h:00min) dos dias 0, 5, 10 ou 15 dias de tratamento com amoxicilina e/ou PBS.

5.3.1 Método visual

O método visual foi baseado na abertura vaginal, presença de coloração rosa e tecido edemaciado, na qual os animais foram posicionados com as patas dianteiras apoiadas nas gaiolas e fotografias representativas foram obtidas na mesma área, iluminação e localização na sala experimental para cada estágio do ciclo estral analisado (CHAMPLIN et al., 1973; BYERS et al., 2012).

5.3.2 Citometria de fluxo e citologia vaginal

Para confirmação do ponto do ciclo em que as fêmeas se encontravam, a secreção vaginal foi obtida através de um lavado vaginal com 20uL de PBS estéril; com uma pipeta conta-gotas, o volume foi introduzido e recolhido vagarosamente por 3 vezes da vagina do animal; 10uL da amostra foram diluídos 1:20 em PBS estéril, sendo avaliada em citômetro de fluxo (Guava® easyCyte Flow Cytometer - Merck Millipore) em 20mil eventos, diferenciando as fases por meio da complexidade interna e tamanho das células (POLONIO, 2017).

Na citologia vaginal, os outros 10uL da secreção vaginal foram distribuídos sobre lâmina de vidro e avaliados em microscopia de campo claro em ocular 4x, determinando-se a fase do ciclo pela presença de células epiteliais nucleadas, cornificadas e presença de leucócitos (BYERS et al., 2012; POLONIO, 2017).

5.4 Pesagem e coleta das amostras (fezes e órgãos)

Os animais foram pesados diariamente durante o período de tratamento e analisados quanto à sobrevivência. As fezes dos animais foram coletadas a fresco por estimulação do esfíncter anal e armazenadas em tubos eppendorf estéril nos dias 0 e 15 após o início do tratamento; imediatamente após a coleta parte das fezes foram mantidas sob refrigeração (-20°C) até as próximas análises.

No 15º dia de tratamento com amoxicilina, os animais foram eutanasiados com utilização de anestésico Ketamina (70mg/Kg) e relaxante muscular Xilazina (6mg/Kg); posteriormente o deslocamento cervical foi realizado e as amostras de ceco e ovários foram coletadas e armazenadas em reagente TRIzol® (Invitrogen)

5.5 Extração de DNA e identificação da microbiota por *metabarcoding*

O DNA total presente nas fezes dos animais tratados foi extraído, utilizando-se o kit de extração de DNA QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN). A qualidade do DNA foi analisado por quantificação fluorimétrica em Qubit®, utilizando-se sondas específicas para DNA dupla fita (ThermoFischer Scientific). O DNA foi enviado à empresa Genone (Rio de Janeiro – RJ), onde se preparou a

biblioteca de *amplicons* do DNA codificador do rRNA 16S de regiões distintas (16SV4/16SV3/16SV3-V4/16SV4-V5) utilizando-se iniciadores específicos contendo *barcode*. Todas as reações de PCR foram feitas utilizando-se o Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs) e os produtos de amplificação foram quantificados e qualificados de acordo com o tamanho (400-450pb) em gel de agarose a 2%. Os produtos de amplificação selecionados misturaram-se em quantidades iguais para a confecção das bibliotecas segundo as recomendações técnicas do kit TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit (Illumina, USA). O sequenciamento das bibliotecas foi realizado utilizando-se a plataforma IlluminaHiSeq2500 (Illumina USA). Todo o protocolo seguiu o fluxograma seguinte (Figura 5). O resultado do sequenciamento foi analisado utilizando-se várias ferramentas de bioinformática (Upase v7.0.1001 e GreenGene Database) para análises de similaridade e PyNAST software (Version 1.2), para análises filogenéticas.

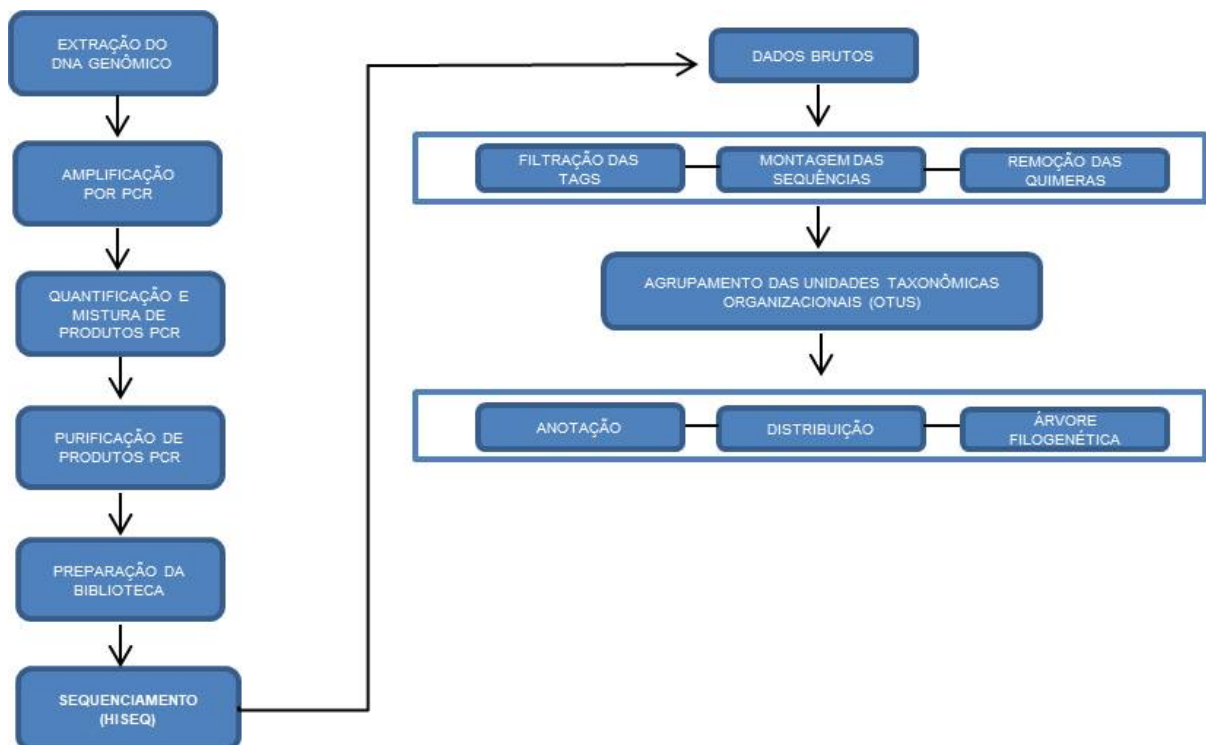


Figura 5. Fluxograma representativo do preparo e sequenciamento por metabarcoding. Fonte: Adaptado de GENOME BIOTECHNOLOGIES.

5.6 Extração de RNA e análise da expressão diferencial de genes por PCR em tempo real

Para a análise da expressão diferencial de genes codificadores das citocinas pró-inflamatória (*IL-1 β*) e anti-inflamatória (*IL-10*) o RNA total dos tecidos ovariano e intestinal foram extraídos utilizando-se o reagente TRIzol® (Invitrogen). O RNA total foi quantificado e 1 μ g de RNA total foi utilizado para a síntese do cDNA fita simples de acordo com os dados do fabricante utilizando-se o kit Illustra Ready-to-Go RTPCR Beads (GE Healthcare). As reações da PCR foram realizadas no equipamento ABI 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) utilizando-se SYBR Green para a detecção das fitas duplas de DNA sintetizadas. Os *primers* foram usados para amplificar um fragmento específico de 100-120-bp correspondente aos alvos específicos (Tabela 1). Todos os dados são apresentados como unidades de expressão relativa após normalização para o gene codificador da β -actina. As avaliações da PCR foram realizadas em triplicata. As diferenças na expressão relativa foram analisadas por análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 1. Sequência dos iniciadores das interleucinas para ensaios de PCR em tempo real.

Primer	Sequência
IL-1 β F	5'-TGACCTGGGCTGTCCAGATG-3'
IL-1 β R	5'-CTGTCCATTGAGGTGGAGAG-3'
IL-10 F	5'-GGTTGCCAAGCCTTATCGGA-3'
IL-10 R	5'-ACCTGCTCCACTGCCTTGCT-3'
β -actina F	5'-AGGTGTGCACCTTTTATTGGTCTCAA-3'
β -actina R	5'-TGTATGAAGGTTTGGTCTCCCT-3'

5.7 Leucograma

Para a realização do leucograma, coletaram-se amostras sanguíneas pela via de plexo retro orbital, armazenadas em tubos previamente identificados contendo anticoagulante EDTA. Posteriormente, as amostras foram utilizadas para a confecção do esfregaço sanguíneo em lâminas de vidro, e corado pelo método de Romanowsky (eosina, azul de metileno). Após secagem, os mesmos foram

avaliados em microscópica de campo claro em ocular 100x com auxílio do óleo de imersão, onde foi empregado o método de varredura com contador eletrônico de células (Leucotron LS11) para contagem diferencial (valor relativo %) dos leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócito e linfócitos).

5.8 Análise estatística

Todos os experimentos foram repetidos ao menos duas vezes com resultados similares. As figuras apresentadas neste trabalho indicam o resultado mais representativo obtido. Os gráficos e as análises estatísticas foram feitos utilizando-se o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc). Os dados distribuição de normalidade foram verificados pelo teste D'Agostino-Pearson. As médias das variáveis não paramétricas foram comparadas pelo teste *t* de Student quando havia duas médias a serem avaliadas ou por ANOVA, seguida do teste de Tukey, quando mais de duas médias foram avaliadas. O nível de significância adotado nas análises foi de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 O uso contínuo de amoxicilina acarreta disbiose intestinal murina

Com o intuito de avaliar se o uso contínuo da amoxicilina poderia induzir a disbiose intestinal em camundongos fêmeas com 7 e/ou 8 semanas da linhagem 129Sv/Ev, o DNA total proveniente das fezes dos animais tratados com o antibiótico ou com PBS foi extraído e, por meio de análises de metagenômica do gene codificar do rRNA 16S, esse DNA foi avaliado. A fim de analisar a diversidade de espécies em cada amostra, todas as sequências obtidas foram agrupadas por 97% de similaridade de sequência de DNA em OTUs (Unidades taxonômicas operacionais). As análises da metagenômica demonstraram que a utilização da amoxicilina acarretou alteração nas OTUs quando comparadas ao grupo tratado com PBS (Figura 6). Foi possível observar que os animais sob tratamento com a amoxicilina apresentaram aumento na abundância relativa do filo Proteobacteria e diminuição de Bacteroidetes e Firmicutes, quando comparados com os animais tratados com PBS (Figura 6).

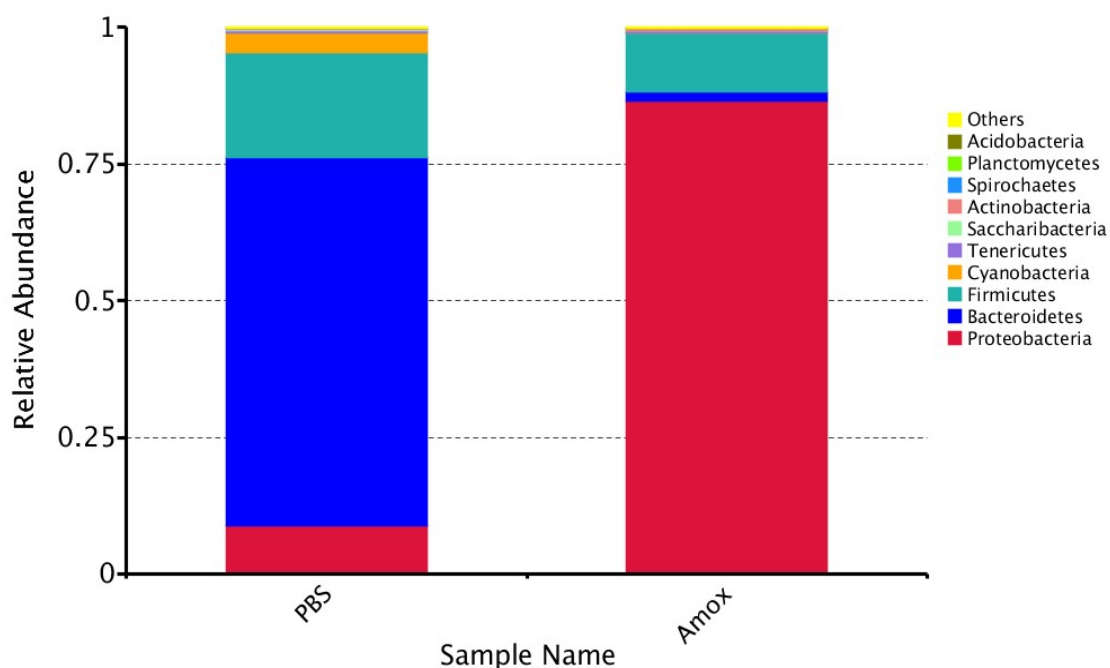


Figura 6. Abundância relativa dos filos bacterianos dos animais tratados com amoxicilina ou PBS. As barras apresentadas na figura demonstram o nível relativo dos filos bacterianos presentes nos grupos em estudo. Cada filo está representado por uma cor específica, tendo, assim, uma abundância relativa diferente, comparando-se os grupos amoxicilina (Amox) e PBS.

Avaliando os gêneros bacterianos prevalentes nos animais em disbiose, foi possível observar que houve uma abundância relativamente alta dos gêneros *Klebsiella*, *Helicobacter* e *Morganella* quando comparados ao grupo PBS. Já nos animais tratados com PBS, foi possível identificar maior abundância relativa de bactérias das famílias *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*, *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* (Figura 7).

A partir dos dados de metagenômica, os cem gêneros prevalentes nas duas amostras foram selecionados, e a árvore evolutiva foi montada, usando-se as sequências representativas alinhadas que podem ser observadas na Figura 8.

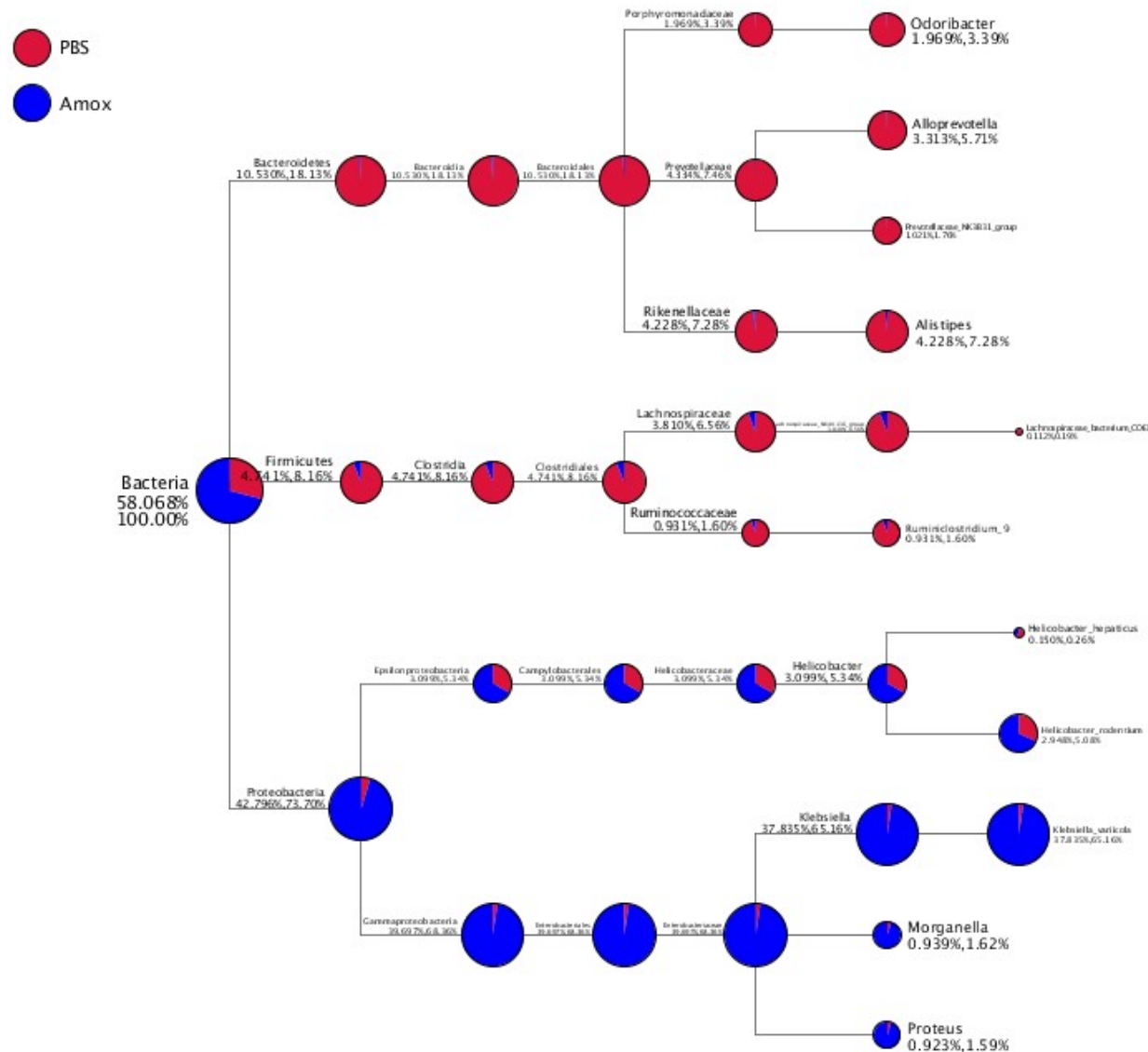


Figura 7. Abundância relativa de grupos bacterianos presentes em fezes de animais em disbiose induzida pela amoxicilina (azul) quando comparados com animais sem disbiose intestinal (vermelho). Árvore taxonômica de espécies específicas em camundongos tratados com PBS (vermelho) ou Amoxicilina (azul). O tamanho dos círculos representa a abundância relativa de espécies. O primeiro número abaixo do nome taxonômico representa a porcentagem em todo o táxon, enquanto o segundo número representa a porcentagem no táxon (reino, filo, classe, ordem, família, gênero e espécie).

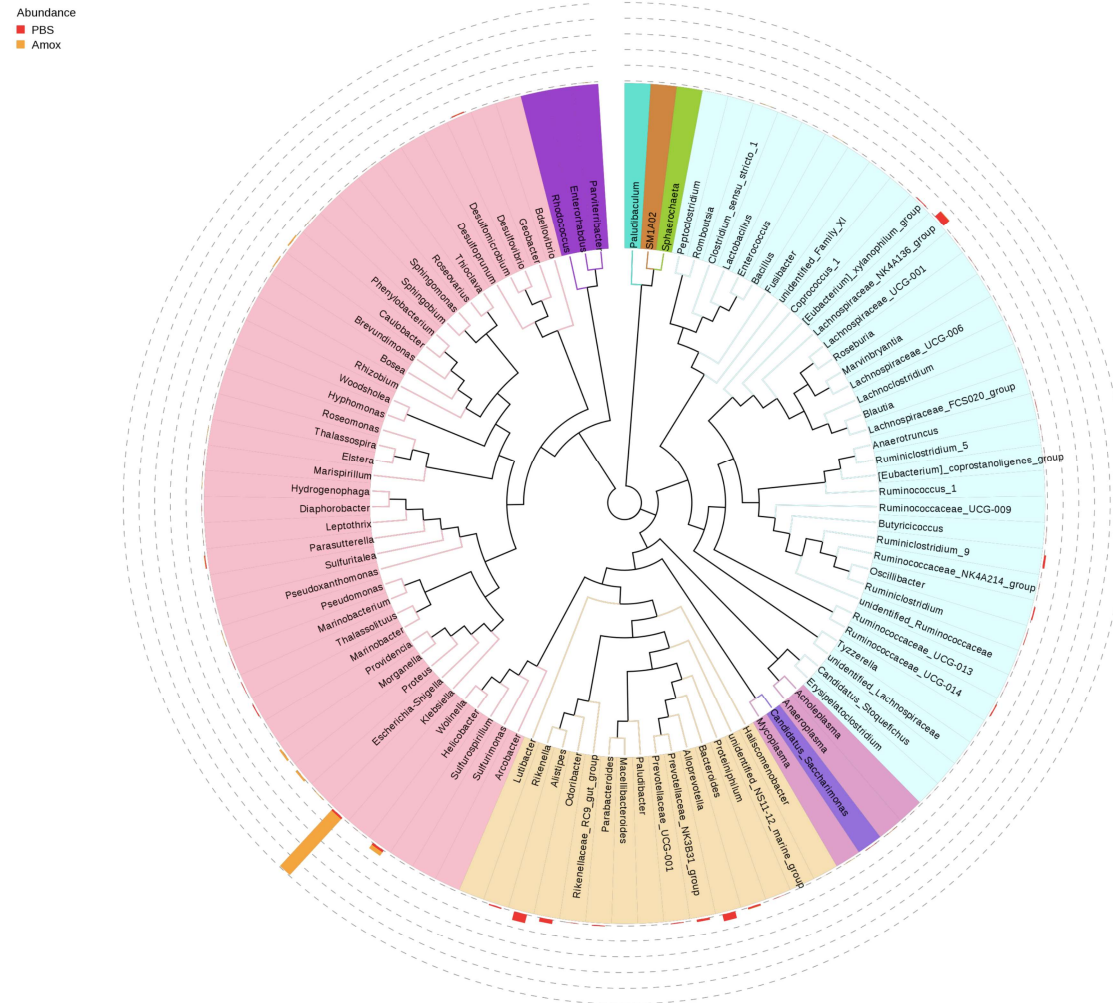


Figura 8. Abundância relativa dos 100 principais gêneros dos grupos bacterianos presentes em fezes de animais em disbiose induzida pela amoxicilina (amarelo) quando comparados com animais sem disbiose intestinal (vermelho). Árvore evolutiva dos 100 principais gêneros bacterianos; Cores diferentes dos ramos representam diferentes filos. À abundância relativa de cada gênero em cada grupo foi exibida fora do círculo e as diferentes cores representam diferentes grupos.

6.2 A disbiose induzida pela amoxicilina não altera a sobrevida de camundongos nem a contagem diferencial de leucócitos circulantes

Com o objetivo de avaliar a sobrevida dos animais tratados com amoxicilina ou PBS durante os dias experimentais incluindo as coletas das amostras de fezes e sangue, os grupos foram monitorados diariamente. Apesar das diferenças nos grupos bacterianos intestinais, não houve influência na sobrevida dos animais. Ambos os grupos obtiveram uma sobrevida de 100% durante todo o tratamento e coleta de amostras (Figura 9).

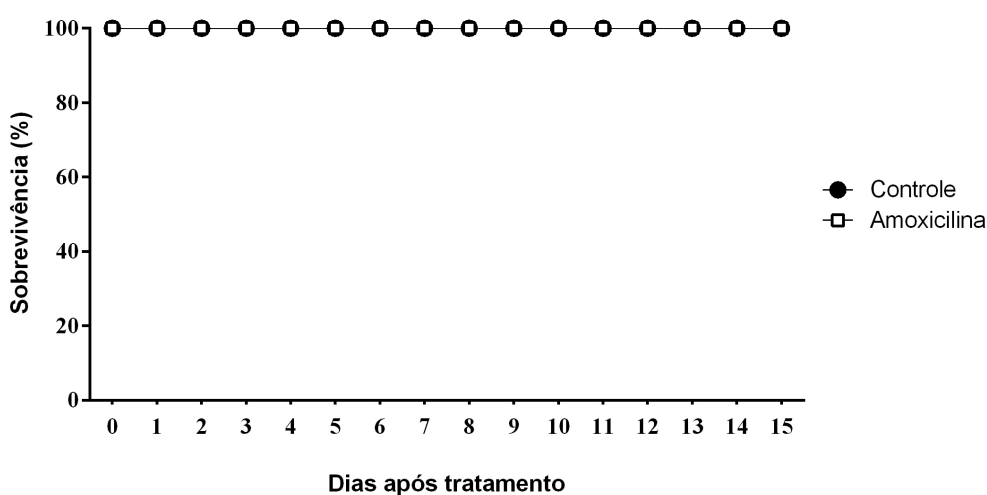


Figura 9. A disbiose intestinal induzida pela amoxicilina não influencia na sobrevida dos animais. Camundongos tratados com amoxicilina (quadrado vazio) (n=4) ou com PBS (círculo cheio) (n=4), não apresentaram óbito durante todo o tratamento, incluindo a etapa de coleta das amostras de fezes e de sangue. (*) $p < 0,05$.

A fim de avaliar se houve alteração na contagem relativa dos leucócitos circulantes presentes nos grupos tratados com amoxicilina ou PBS, foram coletadas amostras de sangue dos animais e o número relativo dos leucócitos foram avaliados pela técnica do esfregaço sanguíneo e analisados por microscópica de campo claro. Os resultados demonstraram que os linfócitos, os neutrófilos, os monócitos e os eosinófilos apresentaram valores relativos (%) diferentes para cada tipo celular, porém não houve diferenças estatísticas entre os grupos tratados com amoxicilina e os tratados com PBS. Já os basófilos, não foram encontrados em ambos os grupos estudados (Figura 10).

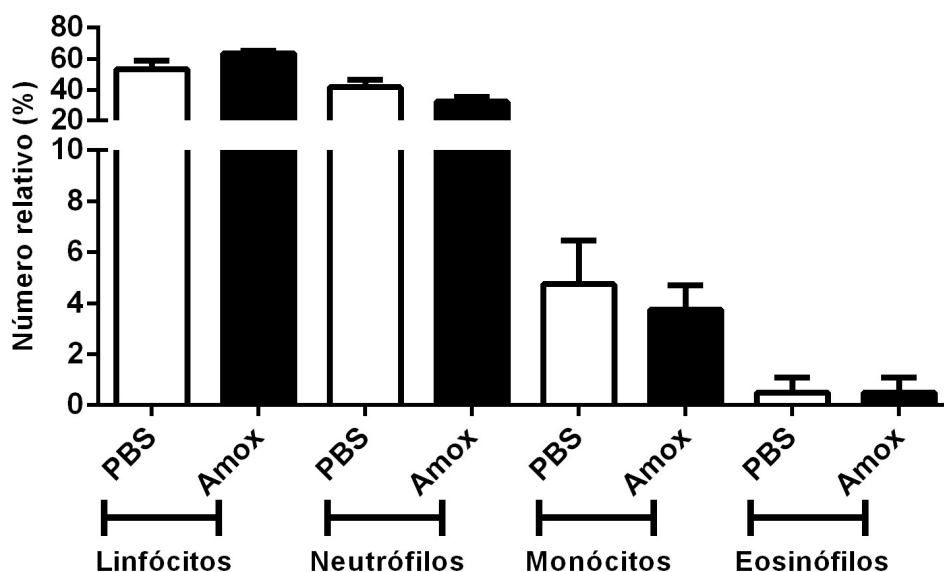


Figura 10. Contagem diferencial dos leucócitos circulantes presentes nas amostras de sangue dos camundongos disbióticos (n=4) (colunas pretas) e não disbióticos (n=4) (colunas brancas). Os valores relativos (%) do número de células leucocitárias não apresentaram diferença estatística entre os grupos tratados com amoxicilina e o PBS. (*) $p < 0,05$.

6.3 A disbiose intestinal induzida pela amoxicilina altera o ciclo estral dos camundongos, aumenta o peso dos animais e diminui o número absoluto de células na citologia vaginal

Para caracterizar e confirmar as fases do ciclo estral presentes nos camundongos da linhagem 129Sv/Ev, foram utilizadas as técnicas de análise visual das características e da abertura vaginal, preconizados por Byers et al. 2012 e Champlin, et al 1973, assim como a citologia vaginal e a citometria de fluxo (Figura 11). Os resultados obtidos pelas análises visuais das características e da abertura vaginal demonstraram que, na fase do ciclo estral caracterizada como proestro, a estrutura vaginal apresentou-se com tecido vaginal edemaciado, com coloração rosa, presença de umidade vaginal e abertura ampla com presença de rugas nas regiões dorsais e ventrais do tecido vaginal. Já na fase do estro, houve uma diminuição no edema do tecido vaginal, bem como na coloração rosada, na presença de umidade vaginal e a abertura da vagina se torna mais fechada quando comparada com a fase do proestro. Os estágios de metaestro e de diestro apresentaram abertura vaginal pequena, sem edema de tecido vaginal, diferenciando-se apenas pela presença de tipos celulares no estágio de metaestro (Figura 11A).

Por meio da avaliação citológica, foram caracterizadas as fases do ciclo estral, de acordo com os seguintes parâmetros: ausência, presença ou proporção de tipos celulares, bem como a densidade celular e a disposição das células nas lâminas (Figura 11C). Os resultados obtidos das análises da citologia vaginal demonstraram que, na fase do ciclo estral caracterizado como proestro, observou-se uma abundância de células epiteliais nucleadas, enquanto que, na fase do estro, as características celulares foram de células corneificadas. Já na fase do metaestro, havia poucas células corneificadas e algumas nucleadas acompanhadas por leucócitos. No diestro, observou-se exclusivamente um grande infiltrado leucocitário sem células epiteliais (Figura 11C).

A fim de confirmar os resultados obtidos pela citologia vaginal, as células presentes em cada fase do ciclo estral foram analisadas por citometria de fluxo, caracterizando-as pela complexidade e tamanho celular (Figura 11B). Os resultados obtidos das análises pela citometria de fluxo demonstraram que, na fase do proestro, as células se apresentaram em duas populações definidas, com diferentes tamanhos e complexidades, enquanto que no estro as células estavam em uma única população com menor complexidade que na fase anterior. Na fase de metaestro, as células mostraram alterações na complexidade e no tamanho. Entretanto, na fase de diestro, foram observadas duas populações distintas com células maiores e mais complexas quando comparadas as outras fases do ciclo estral dos animais. (Figura 11B).

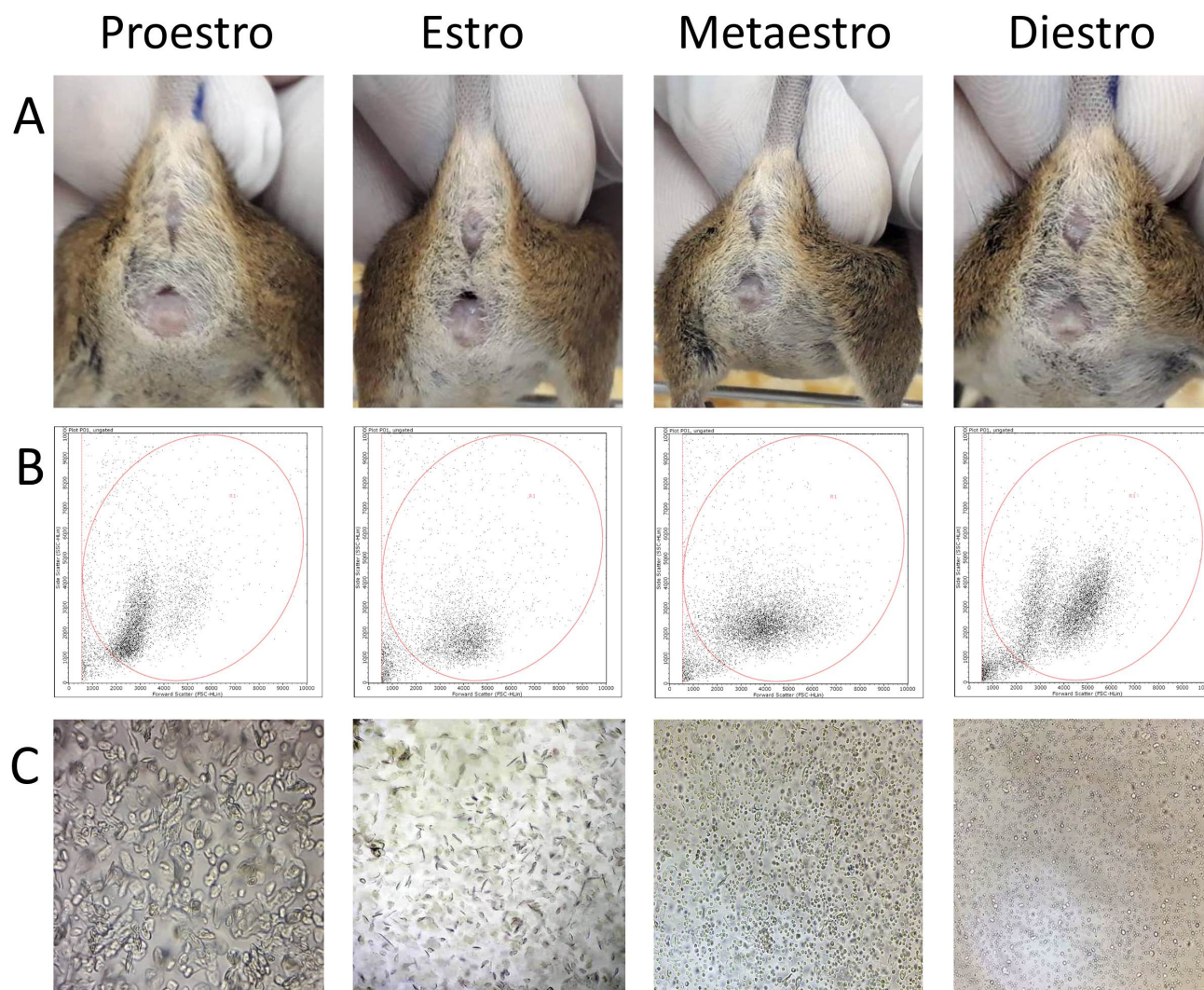


Figura 11. Caracterização do ciclo estral murino pelas análises de visualização vaginal (A), citometria de fluxo (B) e citologia vaginal (C). Ambas as técnicas apresentadas demonstraram diferenças nas características visuais do aparelho reprodutor feminino e dos tipos celulares presentes em cada fase do ciclo estral dos camundongos da linhagem 129Sv/Ev (n=4).

Observando o número de animais em cada fase do ciclo estral dos grupos tratados com amoxicilina ou PBS, foram encontrados no dia 0, em ambos os grupos, três animais em proestro, um em estro, um em metaestro e três em diestro. No 5º dia, havia no grupo controle dois animais em proestro e diestro e, no grupo amoxicilina, um animal em proestro, um, em metaestro e dois, em diestro. No 10º dia, foi encontrado no grupo controle um animal em cada fase e, no grupo amoxicilina, um animal em proestro, dois, no estro e um, no metaestro. Já no 15º dia, foram encontrados um animal em proestro, um em metaestro e dois em diestro no grupo controle e, no grupo amoxicilina, três animais em proestro e um em diestro (Figura 12).

De acordo com os resultados obtidos das caracterizações das fases do ciclo estral presente nos camundongos da linhagem 129Sv/Ev, foi avaliado se a disbiose poderia alterar as fases do ciclo estral dos animais quando comparados com o grupo PBS. As fases do ciclo estral foram analisadas nos seguintes tempos: 0, 5º, 10º e 15º dias de tratamento com amoxicilina ou PBS. Os resultados obtidos demonstraram que os animais disbióticos apresentaram alterações nas fases do ciclo estral quando comparados com o grupo tratado com PBS durante todo o tempo de tratamento (Figura 12). O grupo tratado com PBS apresentou no 15º dia de tratamento um maior número de animais na fase de diestro e números iguais de animais nas fases de proestro e metaestro, sendo encontrada esta última fase somente neste grupo. Já o grupo disbiótico, apresentou mais animais nas fases de proestros do que de diestro e não apresentou a fase de metaestro encontrada no grupo tratado com PBS no décimo quinto dia de tratamento. Ambos os grupos não apresentaram a fase de estro e de metaestro no décimo quinto dia, sendo encontrada a fase de estro somente no 0 e 10º dias em ambos os grupos tratados (Figura 12).

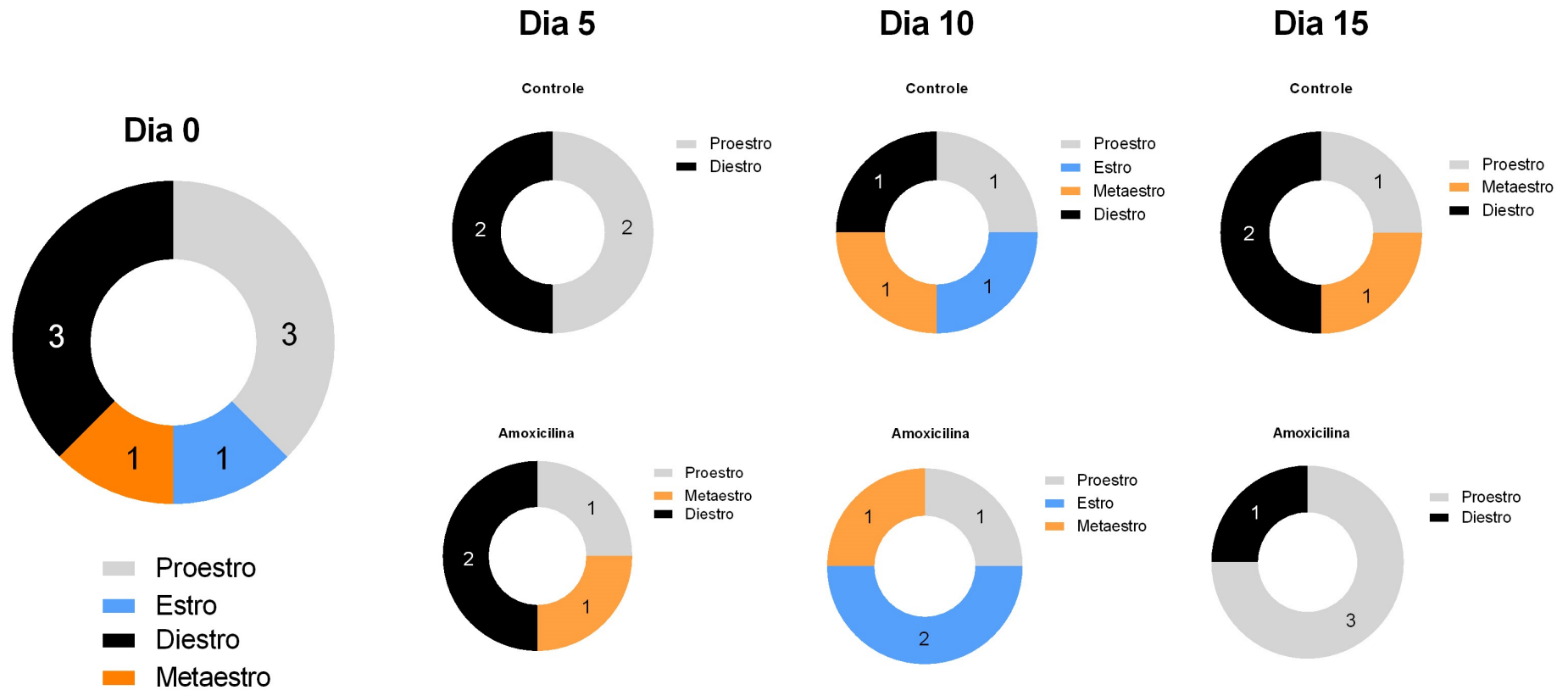


Figura 12. A disbiose intestinal induzida por amoxicilina altera o ciclo estral murino. A figura representa o número de camundongos da linhagem 129Sv/Ev (n=8) presentes em cada fase do ciclo durante 0, 5º, 10º e 15º dias de tratamento com amoxicilina (n=4) ou PBS (n=4). As cores presentes nos círculos representam as fases do ciclo estral, sendo a fase de proestro representada pela cor cinza; o estro, pela cor azul; o metaestro, pela cor laranja e o diestro, pela cor preta. Os tamanhos dos círculos correspondem ao número de animais presentes em cada fase do ciclo. Grupo controle se refere ao tratamento com PBS (n=4) e amoxicilina (n=4) se refere ao grupo tratado com amoxicilina.

Diante dos resultados obtidos pela citologia vaginal, foi realizada a contagem e a média do número total de células presentes no 15º dia de tratamento em ambos os grupos. Os resultados obtidos dessa contagem demonstraram uma redução no número total de células presentes nas fases de proestro e de diestro no grupo tratado com amoxicilina em relação ao grupo tratado com PBS, mostrando que a disbiose do intestino induzida pela amoxicilina diminuiu o número total de células quando comparada com a mesma fase do ciclo estral com o grupo PBS (Figura 13).

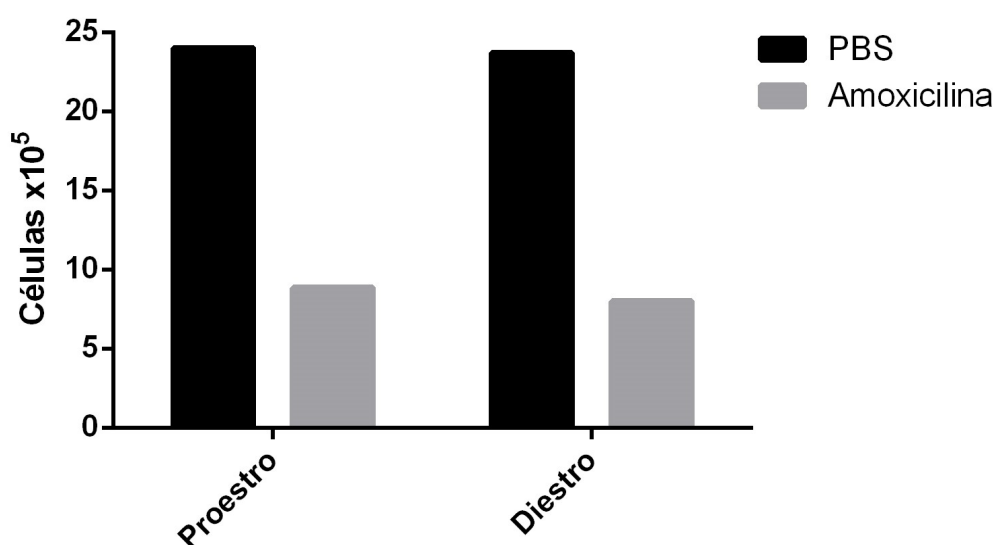


Figura 13. Alteração do número absoluto de células presentes nas fases de proestro ou de diestro em animais tratados com amoxicilina. Contagem do número total de células presentes no 15º dia de tratamento nos grupos tratados com PBS (barras pretas) ou tratados com amoxicilina (barras cinzas).

Para averiguar a influência da disbiose no peso dos animais, foi utilizada a pesagem e a monitorização diária dos animais durante todo o tratamento. Os resultados demonstraram que os camundongos disbióticos ganharam peso quando comparados ao grupo tratado com PBS, de forma significativa a partir do sétimo dia de tratamento com a amoxicilina, como indicado na Figura 14.

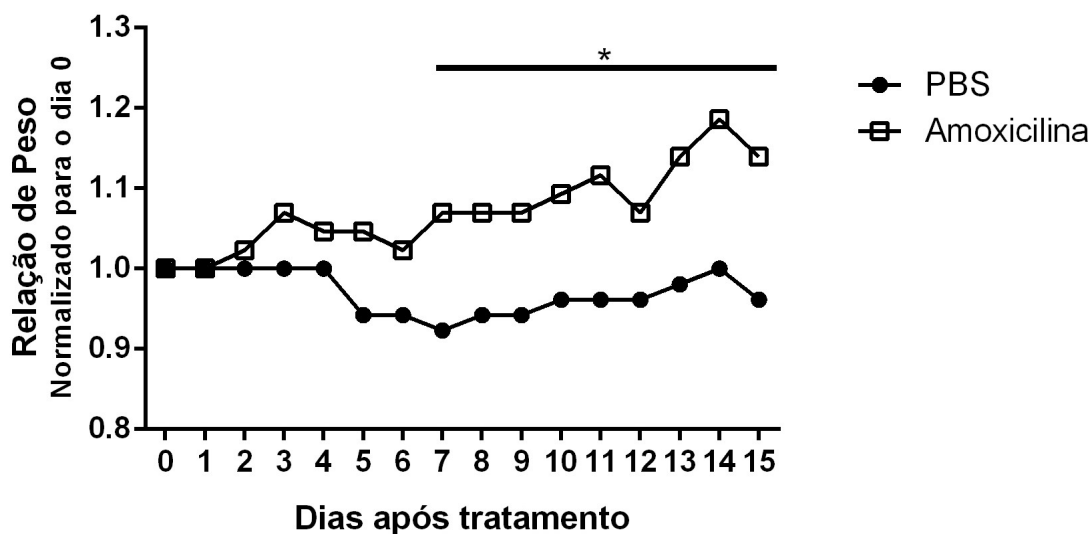


Figura 14. O tratamento contínuo com amoxicilina acarreta ganho de peso corporal de camundongos. A figura representa a razão do peso corporal dos animais em relação ao primeiro dia de tratamento dos grupos tratados com PBS (n=4) (círculo cheio) ou tratado com amoxicilina (n=4) (quadrado vazio). O peso é representado como índice relativo ao dia 0. Diferenças estatisticamente significativas de peso são denotadas por um asterisco *(p <0,05).

6.4 A disbiose intestinal causada pela amoxicilina altera o estado pró-inflamatório do ovário e do ceco de camundongos

Para a avaliação do estado inflamatório do ceco e do ovário dos animais sob tratamento com amoxicilina ou PBS, o RNA total de cada órgão foi extraído para se analisar a expressão diferencial do gene pró-inflamatório *IL-1 β* ou do gene anti-inflamatório *IL-10*. A PCR quantitativa indicou que a *IL-1 β* foi regulada positivamente não apenas no ceco (Figura. 15A) de camundongos disbióticos, mas também no ovário (Figura. 15C) quando comparado ao grupo PBS. Por outro lado, a expressão da *IL-10* diminuiu em ambos os órgãos dos camundongos disbióticos quando comparados com os controles PBS (Figura. 15B e 15D). Os resultados da expressão diferencial de ambos os genes indicam que a disbiose intestinal induzida pela amoxicilina pode influenciar em um estado pró-inflamatório do ovário e do ceco.

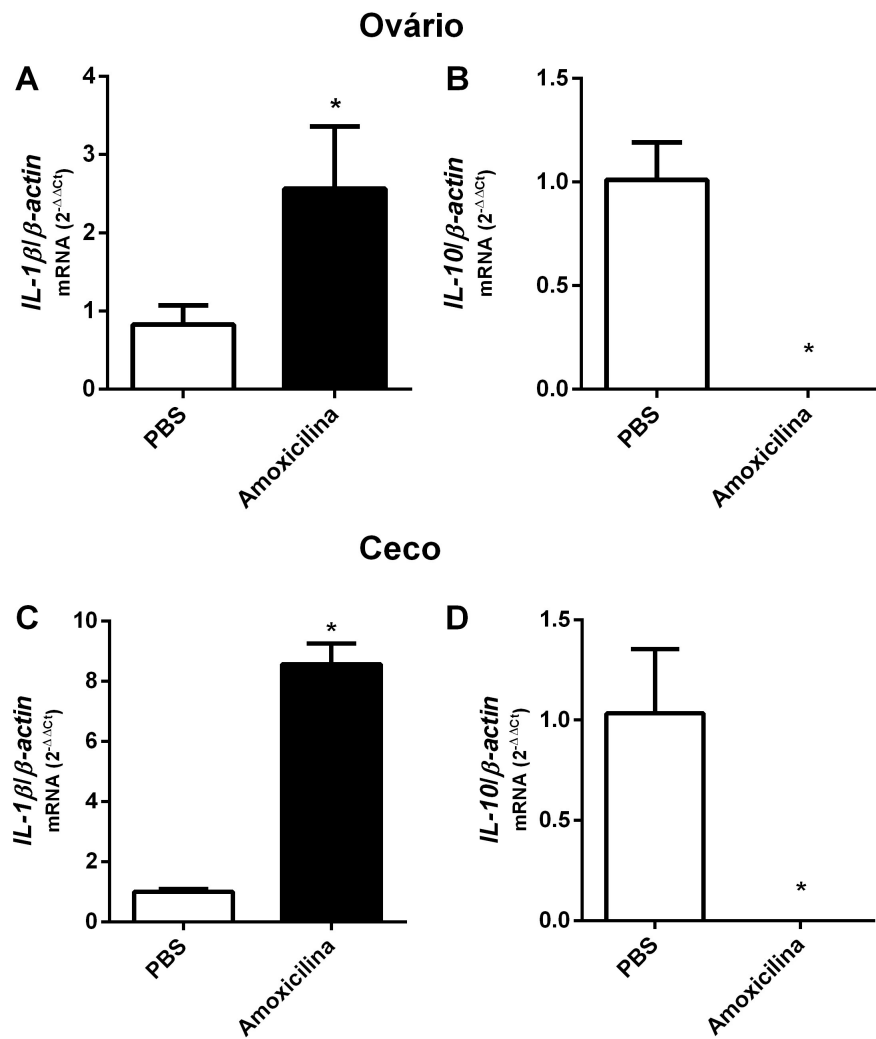


Figura 15. A disbiose intestinal causada pela amoxicilina aumenta a expressão do gene *IL-1β* e diminui da *IL-10* no ovário e no ceco dos camundongos. A expressão diferencial do gene da *IL-1β* foi avaliada no ovário (A) e no ceco (C), do grupo tratado com amoxicilina (n=4) (barra preta) ou PBS (n=4) (barra branca). A expressão gênica da *IL-10* foi avaliada no ovário (B) e no ceco (D), do grupo tratado com amoxicilina (barra preta) ou PBS (barra branca). Diferenças estatisticamente significativas na expressão gênica de citocinas são denotadas por um asterisco * (p < 0,05).

7. DISCUSSÃO

O trato intestinal é amplamente colonizado predominantemente com bactérias do filo Firmicutes (*Bacilli* e *Clostridia*) e Bacteroidetes (*Bacteroides*, *Parabacteroides* e *Prevotella*) (KHANNA; PARDI, 2016). Os resultados deste estudo mostraram uma diminuição nas OTUs nas fezes dos camundongos tratados com amoxicilina quando comparados aos tratados com PBS. Além disso, os resultados confirmam achados anteriores que demonstraram uma diminuição no filo de Firmicutes e um aumento no filo de Proteobacteria de ratos Wistar tratados com amoxicilina (TULSTRUP et al., 2015). O uso da amoxicilina também está associado à diminuição da diversidade bacteriana intestinal, predominantemente pelo aumento do filo Proteobacteria, o que está fortemente associado à incidência de enterocolite necrosante (TULSTRUP et al., 2015).

A microbiota intestinal de roedores, especificamente de camundongos, apresentam micro-organismos Gram-positivos e/ou negativos constituídos pela grande maioria dos filis Bacteroidetes, seguida de Firmicutes e, posteriormente, de Proteobacterias e outros microrganismos (DONALDSON et al., 2015). A microbiota cecal de camundongos desempenha um papel fundamental na digestão murina (DONALDSON et al., 2015). Silveira, 2018 e Donaldson et al., 2015, destacaram que o ceco murino representa a porção inicial do intestino grosso, e que apresentam intensa atividade microbiana neste órgão, demonstrando grande importância nos processos de digestão, de metabolismo e de manutenção microbiana em camundongos (DONALDSON et al., 2015; SILVEIRA, 2018).

Foi demonstrado que o uso de antibióticos contendo anel β -lactâmico como penicilina, metilicina, amoxicilina, ampicilina e uma série de cefalosporinas relatados por Ferreira et al., 2013, podem causar discrasias sanguíneas em raras situações, como leucopenia pela redução de neutrófilos (FERREIRA et al., 2013). Neste estudo, não se observou alteração na contagem relativa dos leucócitos circulantes presentes nos grupos tratados com amoxicilina em relação ao grupo controle. Ghirlinzoni et al., 2012, relatou a não frequência de consequências de alterações sanguíneas pelo uso de antibióticos, em que 3,3% dos casos de animais e humanos que fazem uso de antibióticos sofrem com alterações sanguíneas (GHIRLINZONI et al., 2012). Os resultados obtidos dos valores relativos (%) para cada tipo celular dos leucócitos circulantes em camundongos fêmeas da linhagem

129Sv/Ev seguiram padrões semelhantes aos preconizados por Santos et al., 2016, em camundongos da linhagem C57BL/6 e BALB/c, apresentando valores relativos (%) maiores de linfócitos seguidos de neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos (SANTOS et al., 2016).

Corroborando os nossos resultados de sobrevivência, já foi descrito que o uso da amoxicilina não influencia na sobrevivência de ratos e de camundongos. Vivan et al., 2017; Tulstrup et al., 2016 e Moreal et al., 2015, descreveram que o uso de antibioticoterapia pode causar diversos distúrbios metabólicos, imunológicos e outros. Entretanto, os mesmos autores demonstraram que o uso de antibióticos, como amoxicilina, não interferem na sobrevivência de camundongos, assim como os processos de coletas de amostras biológicas para análises (VIVAN et al., 2017; TULSTRUP et al., 2015; MOREAL et al., 2015).

Apesar das crescentes evidências que correlacionam o desequilíbrio da microbiota com o *status* reprodutivo, demonstrou-se, neste estudo, pela primeira vez, como a disbiose intestinal pode afetar o ciclo estral, enquanto outros trabalhos demonstraram o papel da dieta, influência da microbiota vaginal ou endometrial na maturação oocitária, sobrevivência pré-natal e tamanho da ninhada (CHEN et al., 2017). Além disso, observou-se, neste estudo, uma redução no número de células em cada fase do ciclo estral de animais disbióticos em comparação com a mesma fase no grupo controle. A relação da disbiose intestinal com a saúde geral alterada é mais uma vez evidente, com implicações em locais distantes do trato gastrointestinal.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, observou-se que a disbiose causada pela amoxicilina afetou o ciclo estral reprodutivo dos animais. Karaman; Budak e Ciftci, 2018, evidenciaram que camundongos machos tratados com amoxicilina e gentamicina desenvolveram uma falha na espermatogênese, distorcendo a viabilidade, a motilidade e a morfologia dos espermatozoides, influenciando negativamente na fertilidade reprodutiva (KARAMAN; BUDAK e CIFTCI, 2018). Sendo assim, ambos os estudos ressaltam a importância do entendimento no mecanismo pelo qual os antibióticos interferem na reprodução, contudo este trabalho demonstra, de forma pioneira, como um antibiótico tão usado como a amoxicilina gera a disbiose intestinal, alterando a composição da microbiota e, conseqüentemente, afetando o *status* reprodutivo dos animais.

Foi possível notar que os animais disbióticos ganharam peso durante o tratamento com a amoxicilina. Esse resultado não é novidade, no entanto, desde pouco depois da descoberta da penicilina, notou-se que esses antibióticos melhoraram a taxa de crescimento dos animais de produção quando adicionados à alimentação (MIKKELSEN; ALLIN; KNOP 2016). Ratos *Wistar* ganharam peso e apresentaram um ceco maior quando tratados com o antibiótico (TULSTRUP et al., 2015). Há evidência de que filhotes de roedores recém-nascidos de mães tratadas com antibióticos alteraram a composição da comunidade bacteriana intestinal no início da vida (TULSTRUP et al., 2018).

Para explicar como a alteração da microbiota intestinal induzida pela amoxicilina foi capaz de promover alterações sistêmicas, como alterações no ciclo estral dos animais e ganho de peso, avaliou-se, neste estudo, o estado inflamatório no ceco e no ovário dos animais. Muitos estudos forneceram informações sobre o papel de toda a microbiota no sistema imunológico, havendo evidências de que a microbiota intestinal é essencial para o hospedeiro controlar a inflamação. A microbiota intestinal parece ser crítica para a manutenção de subgrupos de células T que são importantes para a imunidade sistêmica. A microbiota intestinal é necessária para a expansão das células T CD4 +, células T reguladoras, respostas Th1 ou Th2 e células T Th17 (SAMUELSON; WELSH; SHELLITO, 2015). Este trabalho mostrou que a disbiose induzida pela amoxicilina promoveu uma alteração imunológica, com um perfil pró-inflamatório aumentado no ceco e no ovário dos animais, com expressão aumentada do gene codificador da interleucina IL-1 β e uma diminuição na expressão de *IL-10* em ambos os órgãos. Sabe-se que a IL-1 β tem papel fundamental na inflamação aguda e está associada a uma variedade de padrões inflamatórios quando a microbiota intestinal é alterada (SINGH, 2019). Já a IL-10, apresenta uma ação anti-inflamatória e está envolvida no equilíbrio do intestino (YI, 2019). Meijer et al., 2010, demonstraram que mudanças na razão do filo Firmicutes para Bacteroidetes afetam diretamente o estado inflamatório intestinal (MEIJER et al., 2010). Os ácidos graxos de cadeia curta são produzidos a partir do metabolismo das fibras realizado pelos componentes bacterianos da microbiota, havendo evidências de que esses ácidos graxos têm uma função anti-inflamatória, pois afeta a migração de células do sistema imune, a adesão e a expressão de citocinas (MEIJER et al., 2010). Esse mesmo trabalho ressalta que mudanças

nesses filamentos levam a uma diminuição no metabolismo das fibras, culminando em um perfil pró-inflamatório intestinal (MEIJER et al., 2010).

8. CONCLUSÃO

A amoxicilina altera a microbiota intestinal, induzindo a disbiose intestinal murina.

Demonstra que alterações no peso corporal são promovidas, usando-se um antibiótico, um fármaco de moderado espectro, no caso a amoxicilina.

A disbiose intestinal induzida pela amoxicilina não altera a sobrevivência e a abundância relativa (%) dos tipos celulares sanguíneos de camundongos.

Acarreta um estado pró-inflamatório no ovário e no ceco de camundongos isogênicos fêmeas da linhagem 129Sv/Ev.

Proporciona uma alteração no ciclo estral murino.

É de suma importância que os resultados apresentados nesta pesquisa reforcem os estudos da influência dos antibióticos, uma vez que o desequilíbrio da microbiota intestinal promovida por este grupo de fármacos pode acarretar alterações sistêmicas no indivíduo como o estado pró- ou anti-inflamatório nos diversos tecidos, incluindo-se a influência sobre a reprodução animal.

REFERÊNCIAS

- ALMADA C.N; ALMADA C.N; MARTINEZ R.C.R. Characterization of the intestinal microbiota and its interaction with probiotics and health impacts. **Appl Microbiol Boitechnol.** Berlim, v.99, n.10, p.4175-4199, apr. 2015.
- AMADEI, S.U. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **J Bras Patol Med Lab.**, Rio de Janeiro, v.42, n.1, p.5-12, fev. 2006.
- ANDREI, C. et al. The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. **Molecular Biology of the Cell.** [S.l.: s.n.], 1999.
- ANSELMO-FRANCI, J.A; SZAWKA, R.E. Controle neuroendócrino da Reprodução Feminina. In: ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. (eds). **Neuroendocrinologia Básica e Aplicada.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. Cap.22: 318-340.
- APIFARMA. **Repartição do mercado da saúde animal por grupos terapêuticos.** Lisboa: Apifarma, 2011.
- ARRIETA, M.; FINLAY, B. The intestinal microbiota and allergic asthma. **J. Infect.** ,USA, v.69, n.1, p.10-12, nov. 2014.
- BEHR, C. et al. Microbiome-related metabolite changes in gut tissue, cecum content and feces of rats treated with antibiotics. **Toxicology and Applied Pharmacology,** Reino Unido, v.355, n.1, p.198-210, sept. 2018.
- BENAKIS, C. et al. Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal $\gamma\delta$ T cells. **Nat. Med.** , USA, v.22, n.5, p.516-523, may 2016.
- BERCIK, P.; COLLINS, S.M. The effects of inflammation, infection and antibiotics on the microbiota-gut-brain axis. **Advances in Experimental Medicine and Biology,** New York, v.817, n.1, 2014, p.279-289, june 2014.
- BOURLIOUX, P. et al. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium: "The Intelligent Intestine", held In Paris. **Am J. Clin. Nutr.** , Reino Unido, v.78, n.4, p.675-683, oct. 2003.
- BROWN, K. et al. Prolonged antibiotic treatment induces a diabetogenic intestinal microbiome that accelerates diabetes in NOD mice. **The ISME Journal,** USA, v.10, n.2, p.321-332, aug. 2015.

BRAZIL. Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA). **Electronic leaflet (Bulário virtual)**. 2016. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em 26 março. 2019.

BULL, M.; PLUMMER, N. Part I: The Human Gut Microbiome in Health and Disease. **Journal of Integrative Medicine**, China, v.13, n.6, p.17–22, dec. 2014.

BUTEL, M.J. Probiotics, gut microbiota and health. **Med Mal Infect.**, França, v.44, n.1, p.1-8, jan.2014.

CALLEGARI, F.V.R. **Perfil da secreção de progesterona em ratas no proestro: uma nova proposta para o controle do pico pré-ovulatório de LH**. 2008. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2008.

CASSIR, N. et al. Gut microbiota and the pathogenesis of necrotizing enterocolitis in preterm neonates. **Future Microbiol.** , London, v.11, n.2, p.273-292, feb. 2016.

CERVANTES, J. Use your antibiotics wisely. Consequences to the intestinal microbiome. **FEMS Microbiol. Lett.** Holanda, v.363, n.10, p.81-87, may 2016.

CHEN, C. et al. The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. **Nat Commun.**, USA, v.8, n.1, p.1-11, oct. 2017.

CHENG, R.Y. et al. Vancomycin and ceftriaxone can damage intestinal microbiota and affect the development of the intestinal tract and immune system to different degrees in neonatal mice. **Pathog. Dis.** ,USA, v.75, n.8, p.104-113, nov. 2017.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALAGADO, H.R.N. Animais de laboratório: o camundongo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, São Paulo, v. 28, n.1, p.11-23, jul. 2007.

CORSETTI, P.P. et al. Lack of Endogenous IL-10 Enhances Production of Proinflammatory Cytokines and Leads to *Brucella abortus* Clearance in Mice. **Plos One**, USA, v.8, n.9, p.1-11, sept. 2013.

CRUVINEL, W.M. et al. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol**, São Paulo, v. 50, n.4, p. 434-461, jan. 2010.

DI-PAOLO, N.C.; SHAYAKHMETOV, D.M. Interleukin 1 α and the inflammatory process. **Nature immunology**, USA, v.17; n.8, p.906-913, july 2016.

DIKV, K. et al. Frequent use of antibiotics is associated with colorectal cancer risk: results of a nested case – control study. **Dig. Dis. Sci.**, Reino Unido, v.61, n.1, p.255-264, jan. 2016.

DINARELLO, C.A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annual Review. Immunology**. Colorado, v.27, n.1, p.519-550, apr. 2009.

DONALDSON, G.P.; LEE, S.M.; MAZMANIAN, S.K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nat. Rev. Microbiol.**, USA, v.14, n.1, p.20-32, jan. 2016.

EMANUELE; M.A. et al. Alcohol's effects on female reproductive function. **Alcohol Res Health**. USA, v.26, n.4, p.274-281, jan. 2002

FREEMAN M.E. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: KNOBIL, E.; NEILLI, J.D. **The Physiology of reproduction**. 2.ed. New York: Raven Press, 1994. P. 613-658.

FRANCINO, M. Antibiotics and The Human Gut Microbiome: Dysbioses and Accumulation of Resistances. **Frontiers in Microbiology**, USA, v.12, n.6, p.1543-1554, jan. 2016.

GHAISAS, S. et al. Gut microbiome in health and disease: linking the microbiome–gut–brain axis and environmental factors in the pathogenesis of systemic and neurodegenerative diseases. **Pharmacol. Ther.**, Reino Unido, v.158, n.1, p.52–62, feb. 2015.

GHIRLINZONI. C. et al. Reações cutâneas a drogas em pacientes internados: relato de uma série de casos identificados pela farmacovigilância. **Rev. Bras. Alerg. Immunopatol.**, São Paulo, v.35, n.1, p.30-38, jan. 2012.

GHOSHAL, U.C. Small intestinal bacterial overgrowth and other intestinal disorders, Gastroenterol. **Clin. N. Am.**, Reino Unido, v.46, n.1, p.103-120, mar. 2017.

HUANG, Y.L. et al. Sialic acid catabolism drives intestinal inflammation and microbial dysbiosis in mice. **Nature communications**, USA, v.25, n.6, p.8141-8152, aug. 2015.

JÚNIOR-MESQUITA, D. et al. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev Bras Reumatol.**, São Paulo, v.50, n.5, p.552-580, fev. 2010.

KARAMAN, M.; BUDAK, H.; CIFTCI, M. Amoxicillin and gentamicin antibiotics treatment adversely influence the fertility and morphology through decreasing the Dazl gene expression level and increasing the oxidative stress. **Archives of Physiology and Biochemistry**, Reino Unido, v.20, n.1, p.1-9, june 2018.

KATZUNG, B.G.; TREVOR, A.J. **Farmacologia básica e clínica**. 13.ed. Porto Alegre: AMGH, 2017.

KHANNA, S; PARDI, D.S. Clinical implications of antibiotic impact on gastrointestinal microbiota and Clostridium difficile Infection. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**. USA, v.10, n.10, p.1145-1152, mar. 2016.

KLITZING, E.V. et al. Comprehensive survey of intestinal microbiota changes in offspring of human microbiota-associated mice. **European Journal of Microbiology and Immunology**, Reino Unido, v.7, n.1, p.65-75, mar. 2017.

KONG, L. et al. Nickel nanoparticles exposure and reproductive toxicity in healthy adult rats. **Int. J. Mol. Sci.**, USA, v.15, n.11, p.21253-21269, nov.2014.

IACOB, S.; IACOB, D.G.; LUMINOS, L.M. Intestinal microbiota as a host defense mechanism to infectious threats. **Frontiers in Microbiology**, USA, v.9, n.1, p.3328, jan. 2009.

IFAH- International Federation for Animal Health Europe. **Sales of animal health products**. Brussels: IFAH, 2012.

IZUMI, T. et al. Effect of antibiotic pre-treatment and pathogen challenge on the intestinal microbiota in mice. **Gut Pathog.**, USA, v.8, n.60, p.60, nov. 2016.

KABBANI, T.A. et al. Prospective randomized controlled study on the effects of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 and amoxicillin-clavulanate or the combination on the gut microbiota of healthy volunteers. **Gut Microbes**, New York, v.8, n.1, p.17-32, jan. 2017.

KAUR, S.; RAO, R.; NANDA, S. Amoxicillin: a broad spectrum antibiotic. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. São Paulo, v.3, n.3, p.30-37, july 2011.

KIM, J. et al. Effects of the antibiotics growth promoter tylosin on swine gut microbiota. **J. Microbiol. Biotechnol.**, USA, v.26, n.5, p.876-882, feb. 2016.

KREZALEK, M.A. et al. The intestinal microbiome and surgical disease. **Curr. Probl. Surg.**, Chicago, v.53, n.6, p.257–293, june 2016.

LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2010.

LEE, K.W. et al. Effects of anticoccidial and antibiotic growth promoter programs on broiler performance and immune status. **Res. Vet. Sci.**, Beltsville, v.93, n.2, p.721-728, oct. 2012.

LEE, S. M. et al. Bacterial colonization factors control specificity and stability of the gut microbiota. **Nature**, California, v. 501, n.1, p.426–429, sept. 2013.

LEUNG; D.H.; YIMLAMAI, D. The intestinal microbiome and paediatric liver disease. **Lancet Gastroenterol. Hepat.** , Boston, v.2, n.6, p.446–455, june 2017.

LIMA, A.F.K.T; FRANCO, R.P. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), um desafio diagnóstico. **Acta Veterinaria Brasília**, Marília-SP, v.3, n.4, p.123-131, jan. 2010.

LIN, L.; ZHANG, J. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. **BMC Immunol.** , China, v.18, n.2, p.2, jan. 2017.

LONG, J.A; EVANS, H.M. **The oestrus cycle the rat and its associated phenomena**. Berkeley : University of California Press, p.1-148, 1922.

MACKIE, R.I. et al. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **Am. J. Clin. Nutr.** , Reino Unido, v.69, n.5, p.1035-1045, may 1999.

MARCO, B.A. et al. Characteristics, properties and analytical methods of amoxicillin: a review with green approach. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, USA, v.47, n.3, p.267-277, may 2017.

MEIJER, K; VOS, P.D; PRIEBE, M.G. Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health?. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, Antonius Deusinglaan, v.13, n.6, p.715–721, nov. 2010.

MIKKELSEN, K.H; ALLIN, K.H; KNOP, F.K. Effect of antibiotics on gut microbiota , glucose metabolism and body weight regulation: a review of the literature. **Diabetes, Obes Metab.**, Denmark, v.18, n.5, p.444-453, may 2016.

MORAES, A.C.F. et al. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, São Paulo , v.58, n.4, p.317-327, jun. 2014.

MOREAL, F.B. et al. Prewaning modulation of intestinal microbiota by oligosaccharides or amoxicillin can contribute to programming of adult microbiota in rats. **Nutrition.** , USA, v.31, n.3, p.515-522, mar. 2015.

MORRELL, J.M. et al. Removal of bacteria from boar semen using a low-density colloid. **Theriogenology**, New York, v.126, n.1, p.272-278, mar. 2019.

MOURÃO, P.H.O. et al. Microbiota indígena de seres humanos. **Rev Med Minas Gerais**, Belo Horizonte v.15, n.3, p.177-184, jan. 2005.

NABHANI, A.L. A Weaning reaction to microbiota is required for resistance to immunopathologies in the adult. **Immunity**, Holanda, v.50, n.21, p.1-13, mar. 2019.

NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q. Microbiota gastrointestinal normal na doença e na saúde. In: CASTRO, L.P.; COELHO, L.G.V. (Eds.). **Gastroenterologia**. Rio de Janeiro: Médica e Científica Ltda, 2004. p.1037-1047.

OLIVEIRA, C.M. et al. Citocinas e Dor. **Rev Bras Anesthesiol.**, Botafogo-RJ, v.61, n.2, p. 255-265, abr. 2011.

OLIVEIRA, T.K.B. *et al.* **Princípios Básicos de Pesquisa com Animais de Laboratório**. Aracaju: IFS – Instituto Federal de Educação de Sergipe, 2016.

ORIÁ, R.B; BRITO, G.A.C. **Sistema Digestório: integração Básico-Clínica**. São Paulo : Blucher Open Access, 2016. Cap.15; p.369-88.

ROSA, C.P. et al., Antibiotic-induced dysbiosis effects on the murine gastrointestinal tract and their systemic repercussions. **Life Sci.**, USA, v.207, n.1, p.480-491, aug. 2018.

PAIXÃO, L.A.; CASTRO, F.F.S. A colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. **Universitas: Ciências da Saúde**. Brasília, v.14, n.1, p. 85-96, jun. 2016.

PANTOJA-FELICIANO, I.G et al. Biphasic assembly of the murine intestinal microbiota during early development. **The ISME Journal**, New York, v.7, n.6, p.1112-1115, mar. 2013.

PARASHAR, A.; UDAYAGANU, M. Gut microbiota: implications in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat. Disord.** , USA, v.38, n.1, p.1-7, may 2017.

PASSOS, M.C.F; MORAES-FILHO, J.P. Intestinal microbiota in digestive diseases. **Arq Gastroenterol.** , São Paulo, v.54, n.3, p.255-262, sept. 2017.

PEREZ, H. J.; MENEZE, M. E.; D' CÂMPOR, J. Microbiota intestinal: estado da arte. **Acta Gastroenterológica Latino-americana**. Buenos Aires, v.44, n.3, p.265-272, jan. 2014.

PETERSON, C.T. et al. Immune homeostasis, dysbiosis and therapeutic modulation of the gut microbiota. **Clin. Exp. Immunol.**, USA, v. 179, n.3, p.363-377, mar. 2015.

PETRI, W.A.J. Antimicrobianos (continuação): Penicilinas, cefalosporinas e outros antibióticos β -lactâmicos. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. **Goodman & Gilman: Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11 th ed. New York: McGraw-Hill, 2006. p.891-910.

POLETINI, M.D.O. As proteínas de relógios e o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal de fêmeas de roedores. **Revista da Biologia**, São Paulo, v.9, n.3, p.41-44, dez. 2012.

POLONIO, C.M. **Avaliação da capacidade reguladora de células tronco mesenquimais endometriais no modelo de encefalomielite experimental autoimune**. 2017. Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

RILEY, L.W.; RAPHAEL, E.; FAERSTEIN, E. Obesity in the United States – dysbiosis from exposure to low-dose antibiotics? **Front. Public Health**, USA, v.1, n.69, p.69-, dec. 2013.

ROSENFELD, C.S. Gut Dysbiosis in animals due to environmental chemical exposures. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, USA, v.7, n.396, p.396-413, sept. 2017.

SAMUELSON, D.R.; WELSH, D.A.; SHELLITO, J.E. Regulation of lung immunity and host defense by the intestinal microbiota. **Front Microbiol.**, USA, v.6, n.1085-1099, p.1-14, oct. 2015.

SANTOS, F.A.L. **Análise econômica do uso de antibióticos na fase de recria de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2018. Monografia (Graduação em Zootecnia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

SANTOS, E.W. et al. Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.53, n.2, p.138-145, jan. 2016.

SCHEFFER, J.B. et al. Conhecimento atual do Hormônio Anti-Mülleriano (AMH). **JBRA Assist. Reprod.**, São Paulo, v.15, n.5, p.26-35, oct. 2011.

SINGH, V. et al. Microbiota fermentation-NLRP3 axis shapes the impact of dietary fibres on intestinal inflammation. **Gut**. USA, v.1, n.1, p.1-12, jan. 2019.

SIROIS, Margi. **Medicina de Animais de Laboratório: princípios e procedimentos**. São Paulo: Roca, 2007.

SMITH, M.S; FREEMAN, M.E; NEILL J.D. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. **Endocrinology**, Reino Unido, v.96, n.1, p.219-226, jan. 1975.

SWIDSINSKI, A. et al. Spatial Organization and Composition of the Mucosal Flora in Patients with Inflammatory Bowel Disease. **J Clin Microbiol.** , USA, v.43, n.7, p.3380-3389, july 2005.

TAGUER, M.; MAURICE, C. The Complex Interplay of Diet, Xenobiotics, and Microbial Metabolism in The Gut: Implications for Clinical Outcomes. **Clinical Pharmacology Therapy**, USA, v.99, n.6, p.588-599, june 2016.

TORTORA, G.J. et al. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TULSTRUP, M.V. et al. Antibiotic treatment affects intestinal permeability and Gut Microbial Composition in Wistar Rats Dependent on Antibiotic Class. **PLoS One**, California, v.10, n.12, p.1-17, dec. 2015.

TULSTRUP, M.V. et al. Antibiotic treatment of rat dams affects bacterial colonization and causes decreased weight gain in pups. **Communications biology**, USA, v.1, n.145, p.145-158, sept. 2018.

VILELA, M.G. et al. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. **Femina**, Rio de Janeiro, v.35, n.10, p.667-670, out. 2007.

VIVAN, L. et al. Influence of the fish oil in the gut microbiota of wistar rats (*Rattus norvegicus*) treated with dexamethasone and amoxicillin. **Microbial Pathogenesis**, USA, v.113, n.1, p.45-50, dec. 2017.

WALPORT, M. *et al.* **Imunobiologia de Janeway**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed. 2014.

WILLIAMS, C.L.; STANGEL, G.M. Estrógenos e progestogênios. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 1996. cap.57, p.1045-1067.

WILLIAMS, D.A.; LEMKE, T.I. **Foye's principles of medicinal chemistry** . Philadelphia- United States of America : Wolters Kluwer Health/ Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

YANG; B. et al. Associations of antibiotic use with risk of primary liver cancer in the Clinical Practice Research Datalink. **Br. J. Cancer**, London, v.115, n.1, p.85-89, june 2016.

YI, Q. et al. Ascl2 facilitates IL-10 production in Th17 cells to restrain their pathogenicity in inflammatory bowel disease. **Biochem Biophys Res Commun.**, USA, v.510, n.3, p.435-441, mar. 2019.

ZHANG, Y.J. et al. Impacts of gut Bacteria on human health and diseases. **Int. J. Mol. Sci.** , Suíça, v. 16, n.4, p.7493–7519, apr. 2015.

ZARRINPAR, A. et al. Antibiotic-induced microbiome depletion alters metabolic homeostasis by affecting gut signaling and colonic metabolism. **Nature Communications**, USA, v.9, n.1, p. 2872, july 2018.

ANEXOS

Anexo I - Certificado de aprovação CEUA/UNIFENAS.**PARECER N.º 06 A/2018**

A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA –, da UNIFENAS, tendo analisado, nesta data, o protocolo do projeto de pesquisa intitulado **AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HORMONAIS E IMUNOLÓGICOS FRENTE À DISBIOSE CAUSADA PELA AMOXICILINA EM MODELO MURINO**, de autoria da Profa. Patrícia Paiva Corsette de Almeida, resolveu enquadrá-lo na categoria de aprovado.

Alfenas, 28 de março de 2018.

Profª. Dra. Maria Cristina da Costa Resck
Coordenadora do CEUA

Data para apresentação do Relatório Final: 01/08/2019

Modelo, do Relatório Final e Parcial: <http://www.unifenas.br/pesquisa/>

CEUA – UNIFENAS – (35) 3299-3137 ceua@unifenas.br