



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DIANA GOMES DE OLIVEIRA VASCONCELOS

**AÇÃO DO FRUTO-OLIGOSSACARÍDEO E GALACTO-  
OLIGOSSACARÍDEO SOBRE A DEPRESSÃO COMÓRBIDA  
EM MODELO ANIMAL DE OBESIDADE**

Recife – PE

2022

DIANA GOMES DE OLIVEIRA VASCONCELOS

**AÇÃO DO FRUTO-OLIGOSSACARÍDEO E GALACTO-  
OLIGOSSACARÍDEO SOBRE A DEPRESSÃO COMÓRBIDA  
EM MODELO ANIMAL DE OBESIDADE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico.

Orientador: Christina Alves Peixoto

Coorientador: Igor Henrique Rodrigues de Paiva

Recife – PE

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Vasconcelos, Diana Gomes de Oliveira.

Ação do fruto-oligossacarídeo e galacto-oligossacarídeo sobre a depressão  
comórbida em modelo animal de obesidade / Diana Gomes de Oliveira  
Vasconcelos. - Recife, 2022.

52 p. : il.

Orientador(a): Christina Alves Peixoto

Coorientador(a): Igor Henrique Rodrigues de Paiva

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de  
Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Farmácia - Bacharelado, 2022.

Inclui referências, anexos.

1. microbiota. 2. prebióticos. 3. depressão. 4. obesidade. I. Peixoto, Christina  
Alves. (Orientação). II. Paiva, Igor Henrique Rodrigues de. (Coorientação). III.  
Título.

610 CDD (22.ed.)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA**



Aprovada em: 21/10/2022.

**BANCA EXAMINADORA**

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** CHRISTINA ALVES PEIXOTO  
Data: 27/10/2022 16:17:30-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Profa. Dra. Christina Alves Peixoto  
(Orientadora)  
Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** RICARDO BRANDAO  
Data: 21/10/2022 11:27:04-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Prof. Dr. Ricardo Brandão  
(Presidente e Examinador)  
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** KARLA PATRICIA DE SOUSA BARBOSA TEIXI  
Data: 24/10/2022 07:31:50-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Profa. Dra. Karla Patrícia de Sousa Barbosa Teixeira  
(Examinadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Ma. Ingrid Prata Mendonça  
(Suplente)  
Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta monografia aos meus pais. Damiana Gomes de Almeida Vasconcelos e Inaldo de Oliveira Vasconcelos, e à minha irmã, Daiana Gomes de Almeida Vasconcelos, por seu amor incondicional e por serem meu suporte em absolutamente todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, por ter me proporcionado tantas oportunidades e por ter concedido saúde, paciência e força para vencer todos os obstáculos e chegar até aqui.

À minha família e em especial, meus pais, Damiana e Inaldo, por serem meu alicerce, meus maiores exemplos de amor, superação e força. São a minha base e os seres humanos mais iluminados que eu conheço. Obrigada por todo o incentivo, apoio e por tornaram tudo isso possível.

À minha irmã, Daiana. Obrigada por ser minha outra metade, me acompanhar em todas as vivências e ser a melhor amiga que eu poderia ter.

Ao meu namorado e companheiro de vida, João Neto. Obrigada por me acalmar, me apoiar, me incentivar sempre a dar o meu melhor em tudo o que faço e acreditar em mim. Alguém extremamente importante nessa e em todas as outras jornadas.

Aos meus amigos da graduação, que me acompanharam nos infindáveis dias de estudo, nas noites que antecipavam provas importantes. Nos momentos mais felizes e nos mais difíceis vividos dentro dessa universidade se fizeram presente e tornavam tudo mais leve. Essa caminhada não seria a mesma sem tê-los comigo. Nosso eterno grupo carinhosamente apelidado de “Farmaland”: João Carlos, Artur Vinícius, Eduarda Melquiades, Heloisa Dantas, Thiago Lira, Carla Castelo, Heloisa Eduarda e Clarice Valentim.

Ao meu amigo e irmão de consideração, Keven Karlos. Aquele que me salvou e salva todas as vezes que o tema é tecnologia. Obrigada por esse elo tão lindo que vai além de uma amizade. Sou mais feliz por tê-lo em minha vida.

À Dra Christina Peixoto pela oportunidade incrível de realizar esse projeto sob sua orientação. A senhora foi realmente um guia para que tudo acontecesse da melhor forma possível. Obrigada por ter contribuído tanto para a profissional que desejo ser. Ao meu coorientador, Igor Paiva, pela paciência em ensinar tudo o que aprendi, por me encorajar e confiar em mim, mesmo quando eu não confiava. Obrigada por além de tudo, ser meu amigo. A todos que fazem parte do Laboratório de Ultraestrutura, obrigada pelo acolhimento que recebi desde o primeiro dia. Tenho um carinho imenso por todos e sinto-me verdadeiramente parte de uma família. É imensurável o quanto cresci neste lugar.

E a todos os professores que cruzaram meu caminho ao longo da graduação. Com certeza levo aprendizado não apenas profissional, mas pessoal, para a toda a vida. Obrigada pela partilha constante de conhecimentos e por terem dado tudo de si da melhor forma que podiam.

## RESUMO

A obesidade é uma preocupação emergente de saúde que acomete milhares de pessoas ao redor do mundo. Indivíduos obesos apresentam maior risco ao desenvolvimento de comorbidades, incluindo doenças neuropsiquiátricas como a depressão. Dessa forma, percebe-se um aumento de pesquisas que avaliam os transtornos depressivos e sua associação com o consumo de dietas hipercalóricas e apontam uma ligação direta e complexa entre o eixo intestino-cérebro. Os prebióticos, fibras dietéticas advindas da alimentação, apresentam-se como estratégia terapêutica promissora no auxílio do tratamento convencional da depressão. O objetivo do presente trabalho é avaliar a ação dos prebióticos (FOS e GOS) associados ou não com a fluoxetina na modulação da neuroinflamação, cognição e depressão em modelo experimental de obesidade induzido por dieta em camundongos machos C57BL/6 wild type. Para isso, o delineamento experimental do estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 135/2018). Foram utilizados animais, adultos jovens (8-10 semanas), distribuídos nos seguintes grupos (n=15): 1) Controle; 2) HFD; 3) HFD + Fluoxetina; 4) HFD+FOS+B-GOS. Durante 18 semanas foi realizada indução da obesidade e nas últimas seis semanas administraram-se os tratamentos. Ao final do experimento, os animais foram anestesiados com injeção i.p. de ketamina (115mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e eutanasiados. O sangue, córtex pré-frontal e o hipocampo foram retirados para análises posteriores. Avaliou-se o perfil lipídico (Colesterol total e triglicerídeos) e glicose dos animais e foram realizados ensaios comportamentais (teste de splash de sacarose, teste de suspensão em cauda e teste de nado forçado), nos quais verificou-se diferença significativa entre os grupos HFD e HFD + prebióticos, indicando melhora no comportamento do tipo depressivo e diminuição dos parâmetros bioquímicos analisados. Além disso, os animais tratados com prebióticos apresentaram diminuição de ganho de peso corporal quando comparados ao grupo HFD. O grupo HFD apresentou diminuição significativa da expressão de BDNF e do NeuN nas células neuronais do hipocampo em relação ao grupo controle, indicativo de baixa neuroplasticidade e sobrevivência celular que, por sua vez, foram revertidas pelo tratamento com prebióticos. Através das técnicas de imuno-histoquímica e Western blotting, os marcadores inflamatórios (TNF- $\alpha$ , COX-2, Iba-1, GFAP e p-p38) apresentaram aumento significativo no córtex pré-frontal e hipocampo do grupo HFD, enquanto a proteína de junção ZO-1 mostrou baixa expressão. Porém, FOS e GOS modularam a expressão dos marcadores inflamatórios e recuperou os níveis de ZO-1. Conclui-se, a partir do exposto, que a modulação da microbiota

intestinal promovida pelos prebióticos parece ser uma estratégia terapêutica que pode auxiliar na redução da neuroinflamação e morte neuronal da depressão comórbida à obesidade induzida por dieta.

**Palavras-chave:** microbiota; prebióticos; depressão; obesidade.

## ABSTRACT

Obesity is an emerging health concern affecting thousands of people worldwide. Obese individuals are at greater risk for developing comorbidities, including neuropsychiatric disorders like depression. Thus, there is an increase in research that evaluates depressive disorders and their association with the consumption of hypercaloric diets and points to a direct and complex link between the gut-brain axis. Prebiotics, dietary fibers from food, are presented as a promising therapeutic strategy to aid in the conventional treatment of depression. The objective of the present study is to evaluate the action of prebiotics (FOS and GOS) associated or not with fluoxetine in the modulation of neuroinflammation, cognition, and depression in an experimental model of obesity induced by diet in C57BL/6 wild-type male mice. For this, the experimental design of the study is following the Ethical Principles in Animal Experimentation and was approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals (CEUA 135/2018). Animals were used, young adults (8-10 weeks), distributed in the following groups (n=15): 1) Control; 2) HFD; 3) HFD + Fluoxetine; 4) HFD+FOS+B-GOS. At the end of the experiment, the animals were anesthetized with i.p. of ketamine (115mg/kg) and xylazine (10mg/kg) and euthanized. The blood, prefrontal cortex and hippocampus were removed for further analysis. During 18 weeks, obesity induction was performed and the treatments were administered in the last six weeks. At the end of the experiment, the animals were anesthetized with i.p. of ketamine (115mg/kg) and xylazine (10mg/kg) and euthanized. Blood, prefrontal cortex, and hippocampus were removed for further analysis. The animal's lipid profile (total cholesterol, triglycerides) and glucose were evaluated and behavioral tests were performed (sucrose splash test, tail suspension test, and forced swimming test), in which there was a significant difference between the groups. HFD and HFD + prebiotics, indicating an improvement in depressive-like behavior and a decrease in the analyzed biochemical parameters. In addition, animals treated with prebiotics showed a decrease in body weight gain compared to the HFD group. The HFD group showed a significant decrease in BDNF and NeuN expression in the hippocampal neuronal cells of the animals in the HFD group compared to the control group, indicative of low neuroplasticity and cell survival, which, in turn, were reversed by treatment with prebiotics. Through immunohistochemistry and Western blotting techniques, the inflammatory markers (TNF- $\alpha$ , COX-2, Iba-1, GFAP, and p-p38) showed a significant increase in the prefrontal cortex and hippocampus of the HFD group, while the protein junction ZO-1 showed low expression. However, FOS and GOS modulated the expression of inflammatory markers and recovered ZO-1 levels. It is

concluded, from the above, that the modulation of the intestinal microbiota promoted by prebiotics seems to be a therapeutic strategy that can help to reduce neuroinflammation and neuronal death from depression comorbid with diet-induced obesity.

**Keywords:** microbiota; prebiotics; depression; obesity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Relação entre microbiota intestinal e neuroinflamação.....	20
<b>Figura 2</b> - Acompanhamento do peso corporal .....	27
<b>Figura 3</b> - Testes comportamentais .....	28
<b>Figura 4</b> - Avaliação dos parâmetros bioquímicos .....	29
<b>Figura 5</b> - Imunofluorescência de BDNF no hipocampo .....	30
<b>Figura 6</b> - Imuno-histoquímica de TNF- $\alpha$ no hipocampo .....	32
<b>Figura 7</b> - Imuno-histoquímica de COX-2 no hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B).....	33
<b>Figura 8</b> - Imuno-histoquímica de Iba-1 no hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B).....	33
<b>Figura 9</b> - Imuno-histoquímica de GFAP no hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B) .....	34
<b>Figura 10</b> - Imuno-histoquímica de Neu-N no hipocampo .....	35
<b>Figura 11</b> - Expressão de proteínas no hipocampo através de Western Blotting .....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>5-HT</b>	5-hidroxitriptamina
<b>AGCCs</b>	Ácidos graxos de cadeia curta
<b>BDNF</b>	Fator neurotrófico derivado do cérebro
<b>B-GOS</b>	Bimuno® galacto-oligossacarídeo
<b>BHE</b>	Barreira hematoencefálica
<b>COX-2</b>	Cicloxigenase 2
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FOS</b>	Fruto-oligossacarídeo
<b>GABA</b>	Ácido gama-aminobutírico
<b>GLP-1</b>	Peptídeo semelhante ao glucagon 1
<b>GOS</b>	Galacto-oligossacarídeo
<b>HFD</b>	Dieta rica em gordura ( <i>high fat diet</i> )
<b>HPA</b>	Hipotálamo-pituitária-adrenal
<b>IDO</b>	Indolamina 2,3-dioxigenase
<b>IMC</b>	Índice de massa corporal
<b>ISAPP</b>	International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics
<b>ISRS</b>	Inibidor seletivo de recaptção de serotonina
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator nuclear kappa B
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>Pomc</b>	Pró-opiomelanocortina
<b>PYY</b>	Peptídeo YY
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de crescimento transformador beta
<b>TGI</b>	Trato gastrointestinal
<b>TLR4</b>	Receptor toll-like 4
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>Tregs</b>	Células T reguladoras
<b>TRYCATS</b>	Catabólitos do triptofano
<b>Vigitel</b>	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
<b>ZO-1</b>	Zona ocludina

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 A obesidade.....	14
2.2 A depressão.....	16
2.3 A microbiota intestinal e o eixo intestino-cérebro.....	18
2.4 Prebióticos, modulação da microbiota intestinal e saúde.....	20
3. JUSTIFICATIVA.....	22
4. OBJETIVOS.....	22
4.1 Objetivo geral.....	22
4.2 Objetivo específico.....	22
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
5.1 Desenho do estudo.....	23
5.2 Administração dos Prebióticos e Fluoxetina.....	24
5.3 Avaliação do perfil lipídico.....	24
5.4 Ensaio comportamentais.....	24
5.5 Imunofluorescência para marcador da plasticidade sináptica (BDNF).....	25
5.6 Análise por Imuno-histoquímica dos marcadores de inflamação (GFAP, Iba-1, TNF- $\alpha$ e COX-2) e sobrevivência celular (NeuN).....	25
5.7 Análise da expressão proteica de marcadores da inflamação (TLR4 e p-p38), da junção celular (ZO-1) e sobrevivência celular (NeuN).....	25
5.8 Análise estatística.....	26
6. RESULTADOS.....	26
6.1 Análise do peso corporal.....	26
6.2 Testes comportamentais.....	27
6.3 Perfil bioquímico.....	28
6.4 Imunofluorescência e Imuno-histoquímica.....	30
6.5 Western blotting.....	35
7. DISCUSSÃO.....	37
8. CONCLUSÃO.....	41
9. REFERÊNCIAS.....	42
10. ANEXO A: CEUA.....	52

## 1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a obesidade um dos maiores problemas de saúde pública. Estima-se que em 2025 cerca de 2,3 bilhões de adultos ao redor do mundo estarão acima do peso e destes, 700 milhões de pessoas com obesidade. No Brasil, essa condição crônica aumentou 72% nos últimos treze anos, saindo de 11,8% em 2006 para 20,3% em 2019, como se verifica nos dados coletados pela Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel) de 2019 (ABESO, 2019).

Especialistas e estudiosos da área ainda alertam que pessoas obesas são mais vulneráveis ao desenvolvimento de depressão, não apenas pelas questões fisiológicas e metabólicas, mas também pelo preconceito social que sofrem. Segundo OMS, o Brasil é o país com maior prevalência de depressão na América Latina. É a principal causa de incapacidade em todo o mundo e estima-se que mais de 300 milhões de pessoas, de todas as idades, convivam com esse transtorno (BRASIL, 2022).

A obesidade é uma condição complexa e multifatorial, e existe um crescente número de estudos pré-clínicos que aponta o conceito de sinalização bidirecional entre o eixo intestino-cérebro relacionado com a comorbidade entre doenças gastrointestinais e metabólicas, como a obesidade, doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Doença de Alzheimer, e transtornos de humor, incluindo a depressão (KENNEDY et al., 2014; SMITH; SUTHERL; HEWLETT, 2015). A microbiota intestinal desempenha importantes funções de modulação que contribui para manutenção da saúde do hospedeiro. Alterações no número e na composição desses microrganismos são vistas em diversas condições, incluindo a obesidade, o que pode contribuir para intensificar o estado inflamatório não apenas a nível periférico, mas também no sistema nervoso central (SNC) (CARLESSI et al., 2021). A interação estabelecida entre o intestino e o cérebro envolve vias neurais, imunes e endócrinas e influencia em vários outros processos fisiológicos do organismo. Diante disso, pesquisas são realizadas com o objetivo de desenvolver novas possibilidades terapêuticas para a depressão, entre as quais, os prebióticos despertam grande interesse.

A definição mais recente de prebióticos é de 2017 e foi realizada pela *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISAPP), na qual diz se tratar de “um substrato que é utilizado seletivamente pelos microrganismos do hospedeiro e que confere um benefício à saúde”. Estudos recentes demonstram que prebióticos desenvolvem papel importante na modulação da microbiota intestinal e neuroproteção, aumentando a concentração de bactérias benéficas, bem como, os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)

e receptores glutamatérgicos, atuando, dessa forma, na neuroplasticidade sináptica (BUROKAS et al., 2017; SAVIGNAC et al., 2013). Assim, a administração de prebióticos apresenta-se como estratégia promissora em associação com os tratamentos tradicionais para depressão, como os antidepressivos, atuando sobre as vias de sinalização da neuroinflamação e depressão em modelos animais de obesidade induzida por dieta.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. A OBESIDADE**

A obesidade é definida como um acúmulo excessivo de tecido adiposo no organismo que pode prejudicar a saúde. É um quadro que geralmente encontra-se associado a outras condições, como hipertensão, diabetes e dislipidemias (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017). Para determinar se o indivíduo é categorizado como obeso, o índice de massa corporal (IMC) deve ser igual ou superior a  $30 \text{ kg/m}^2$  (peso corporal dividido pela altura ao quadrado). No entanto, o IMC é apenas uma estimativa aproximada do grau de obesidade, considerando apenas o peso e a altura, assim, se faz necessário observar outros indicadores como o perfil lipídico, circunferência da cintura, entre outros (TCHERNOF; DESPRÉS, 2013; WŁODARCZYK; ŚLIŻEWSKA, 2021). A obesidade está relacionada com o desenvolvimento de várias patologias, como diabetes, doenças cardiovasculares, apneia obstrutiva do sono e osteoartrite (YAZDI; CLEE; MEYRE, 2015).

A explicação mais simples e comum para a origem da obesidade é um desequilíbrio de energia entre as calorias consumidas e as que são utilizadas pelo indivíduo (WŁODARCZYK; ŚLIŻEWSKA, 2021). Isso está atrelado ao modo de vida da sociedade moderna, com maior ingestão de alimentos ultraprocessados e ricos em gordura, sem prática de exercícios físicos. No entanto, é importante perceber que se trata de uma problemática mais complexa, envolvendo não apenas o estilo de vida, mas fatores genéticos, socioeconômicos, ambientais e o comportamento individual (ASADI et al., 2022).

Estudos envolvendo o mapeamento molecular de mutações gênicas causadoras de obesidade em camundongos foi uma das primeiras estratégias para tentar encontrar genes relacionados com o peso corporal. Essas pesquisas demonstraram o envolvimento de genes que codificam o hormônio leptina e seu receptor, além dos receptores para melanocortina e pró-opiomelanocortina (Pomc) (LUTZ; WOODS, 2012; MYERS; LEIBEL, 2015). O apetite é influenciado pela interação entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema endócrino através

do qual os sinais dos órgãos periféricos, principalmente o sistema digestório, são transportados até o SNC. Isso significa que, hormônios como a leptina e a grelina, são produzidos periféricamente, mas regulam o comportamento alimentar atuando no SNC, especialmente no hipotálamo (ASADI et al., 2022). A resistência à leptina, inclusive, é uma das principais características da obesidade, visto que o indivíduo obeso não consegue usufruir da ação de saciedade exercida pelo hormônio.

A via leptina-melanocortina é uma das principais formas de regulação neuroendócrina para a homeostase energética. A leptina é produzida pelo tecido adiposo branco proporcionalmente à gordura corporal. A atuação desse hormônio nos seus receptores expressos no hipotálamo ativa os neurônios pró-opiomelanocortina e estes interagem com outros centros cerebrais, resultando em processos fisiológicos que diminuem a ingestão de alimentos e promovem o gasto energético (SCHELLEKENS; DINAN; CRYAN, 2010).

O excesso de energia proveniente do desbalanço calórico que ocorre na obesidade possui um efeito importante no perfil de risco cardiometabólico, na sensibilidade à insulina e nos altos níveis de triglicerídeos (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017).

Vários estudos sugerem que o tecido adiposo pode secretar aproximadamente mais de 50 hormônios e moléculas sinalizadoras referidas como adipocinas que desempenham um papel essencial na imunidade e no metabolismo da glicose (KIM et al., 2014; KOWALSKI et al., 2017; OLSZANECKA-GLINIANOWICZ et al., 2012). Pessoas obesas apresentam níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda da inflamação. O tecido adiposo de indivíduos obesos secreta predominantemente citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- $\alpha$ , resistina, visfatina, leptina, angiotensina II e inibidor do ativador do plasminogênio, contribuindo assim para a manutenção do estado inflamatório crônico de baixo grau envolvido na progressão da obesidade e suas comorbidades associadas. Por sua vez, o tecido adiposo de indivíduos magros tem sido bem descrito como secretor de adipocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10, IL-13, antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra), fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), adiponectina e apelina (BULLÓ et al., 2003; KHANNA et al., 2022).

Acredita-se que as células imunes mais abundantes no tecido adiposo dos humanos sejam os macrófagos. A inflamação do tecido adiposo está ligada a uma mudança na frequência de macrófagos M2 (anti-inflamatórios) para macrófagos M1 (pró-inflamatórios), que também está correlacionada com a resistência à insulina. Além disso, a obesidade está frequentemente ligada à hipertrofia dos adipócitos, o que aumenta sua distância dos vasos sanguíneos, levando a hipóxia (LIU; NIKOLAJCZYK, 2019), ocasionando fibrose do tecido adiposo e infiltração

de macrófagos para eliminar adipócitos necróticos, desencadeando também uma resposta inflamatória local e a produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 (KHANNA et al., 2022).

## 2.2. A DEPRESSÃO

Segundo o Relatório Mundial de Saúde Mental, divulgado pela OMS no ano de 2022, apenas no primeiro ano da pandemia da Covid-19, 53 milhões de pessoas desenvolveram depressão e outros 76 milhões relataram ansiedade, totalizando 129 milhões de pessoas no mundo acometidas por essas duas doenças neuropsiquiátricas em apenas um ano (BRASIL, 2022). Os principais sintomas relatados na depressão incluem tristeza profunda e duradoura, anedonia, sentimento de culpa, distúrbios do sono e do apetite, entre outros (WALLACE; MILEV, 2017).

Embora a prevalência da depressão seja muito alta, ainda é uma patologia que geralmente tem diagnóstico tardio, além de falhas no tratamento. Existe uma dificuldade de aderência ao tratamento farmacológico devido aos seus efeitos adversos somado ao fato de que as melhoras do quadro ocorrem a longo prazo, cerca de três a seis semanas após início da administração medicamentosa (CARLESSI et al., 2021b; KUNUGI, 2021).

A fisiopatologia da depressão ainda não é bem elucidada. Hipóteses foram levantadas e estudadas ao longo dos anos na tentativa de explicar a etiologia dessa doença.

A teoria da deficiência das monoaminas é a mais utilizada e a mais bem conhecida. A maioria das classes dos antidepressivos objetivam aumentar a concentração de dopamina e serotonina na fenda sináptica, como fazem os Tricíclicos, primeiros fármacos idealizados para esse objetivo, e os Inibidores Seletivos de Recaptação da Serotonina (ISRSs), medicamentos mais novos e mais utilizados na clínica (KUNUGI, 2021). Atualmente já se sabe que os transtornos de humor resultam de uma combinação de fatores, em vários graus, como fatores genéticos, biológicos, ambientais, não necessariamente apenas o desbalanço químico (ALBERT; BENKELFAT; DESCARRIES, 2012). A depressão é geralmente induzida e, por vezes, potencializada, a partir do estresse crônico. Partindo disso, a resposta ao estresse desenvolvida pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) se tornou um dos alvos de estudo para compreensão dessa condição.

Em situações de estresse crônico pode ocorrer hiperestimulação do eixo HPA e resultar na liberação inadequada e excessiva de hormônios como a adrenalina e o cortisol, contribuindo para intensificar o estado inflamatório (DOOLIN et al., 2017). No estado fisiológico, as citocinas periféricas são hidrofílicas e possuem alto peso molecular, portanto, não atravessam

a barreira hematoencefálica (BHE). No entanto, em estados patológicos, como a depressão, a permeabilidade dessa membrana se encontra comprometida, o que permite a passagem dessas substâncias (JEON; KIM, 2016). O estudo desenvolvido por Giridharan et al. (2019) demonstrou uma relação entre depressão e ativação microglial e um aumento nas citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, TNF- $\alpha$  e interferon gama (INF- $\gamma$ ), no cérebro de ratos submetidos ao modelo de estresse por privação materna. Yang e colaboradores (2018) também observaram o aumento das citocinas IL-6 e IL-4 no hipocampo de animais submetidos ao modelo de estresse induzido por cirurgia. Outra pesquisa que demonstra essa relação é a de He e colaboradores (2019), na qual visualizou aumento da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  juntamente com ativação da micróglia no hipotálamo de camundongos com comportamento depressivo induzido por lipopolissacarídeo (LPS). Essas evidências colocam a depressão como uma doença crônica inflamatória e evidencia o papel do sistema imunológico e a participação das citocinas no seu desenvolvimento.

Entre os mecanismos possivelmente envolvidos nos efeitos das citocinas sobre o humor, encontra-se alterações nas atividades de enzimas como a indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) (CAPURON; LASSELIN; CASTANON, 2016; CASTANON; LUHESHI; LAYÉ, 2015). O INF- $\gamma$  é a principal citocina inflamatória que induz maior expressão da IDO, além de outras citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-1 $\beta$  e a prostaglandina PGE2 (OXENKRUG, 2007, 2010). A IDO é a enzima responsável por catalisar a primeira etapa de degradação do triptofano, aminoácido precursor da serotonina, através da via das quinureninas. A ativação aguda dessa enzima é algo benéfico, porém, sua ativação crônica pode ser nociva, visto poder induzir alterações na neurotransmissão serotoninérgica, através da diminuição da síntese de serotonina, além de levar à produção dos derivados neurotóxicos, como os catabólitos do triptofano (TRYCATS) (RÉUS et al., 2015). O estresse oxidativo relatado na depressão, assim como em outras doenças inflamatórias, também pode contribuir para maior atividade da IDO (CHAVES FILHO et al., 2018).

Nas últimas décadas, a microbiota intestinal surgiu como um fator chave que relaciona a obesidade e a depressão. As alterações dessa microbiota vistas na população obesa estão associadas a marcadores de inflamação local, que podem aumentar a permeabilidade do intestino a microrganismos patogênicos. Estes, por sua vez, contribuem para o início da inflamação sistêmica (CANI et al., 2009a; MILANESCHI et al., 2018). É sugerido, então, que mudanças na microbiota intestinal e déficits neurológicos, como a depressão, estejam interligados por meio de estimulação inflamatória direta, produção de substâncias pró-inflamatórias e perda da função imunorreguladora (NEUFELD et al., 2011).

### 2.3. A MICROBIOTA INTESTINAL E O EIXO INTESTINO-CÉREBRO

O trato gastrointestinal (TGI) humano é colonizado por trilhões de microrganismos, com cerca de 1000 a 5000 espécies diferentes, das quais, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* representam os dois filos predominantes. Diferentes estudos demonstram de maneira consistente que a composição da microbiota intestinal em animais obesos difere dos não obesos. A dieta hipercalórica aumenta a razão *Firmicutes/Bacteroidetes* e reduz os níveis de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Akkermansia muciniphila* (CRYAN et al., 2019; LIN et al., 2014). Essas alterações também foram visualizadas em estudos que analisaram o microbioma de pacientes com depressão a partir de amostras fecais (JIANG et al., 2015; NASERIBAFROUEI et al., 2014). Esses microrganismos possuem várias funções, como manter a integridade intestinal, produzir muco, estimular a regeneração do epitélio intestinal e produzir metabólitos como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) (BURGER-VAN PAASSEN et al., 2009).

A microbiota intestinal é um dos fatores que contribui para a resposta fisiológica do organismo em diferentes níveis, influencia na atividade do sistema imunológico e na regulação de neurotransmissores (ANWAR et al., 2019). Pode sofrer interferência de estímulos externos, como alimentação, estresse, processos infecciosos e uso de antibióticos. Esses fatores podem levar à disbiose, um desbalanço entre as bactérias benéficas e patogênicas que pode comprometer a saúde do indivíduo (FORSYTHE et al., 2010).

A comunicação entre o eixo intestino-cérebro é bidirecional e complexa, permitindo que os sinais viscerais do intestino influenciem o SNC de forma direta e indireta, por via neuronal, através do sistema imunológico e por transmissores químicos.

O nervo vago é a via intermediária mais direta entre o intestino e o cérebro (80% das fibras aferentes e 20% das eferentes). As fibras aferentes vagais não chegam a atravessar a camada epitelial da parede digestiva, ou seja, não há uma comunicação direta com a microbiota intestinal (BONAZ; BAZIN; PELLISSIER, 2018), sua interação ocorre apenas com as células enteroendócrinas. Por sua vez, as células enteroendócrinas detectam metabólitos bacterianos, como os AGCCs, além de expressarem os receptores *toll like 4* (TLR4), o que possibilita a detecção de LPS e outros fragmentos de parede celular considerados padrões moleculares associados ao patógeno (WU et al., 2013).

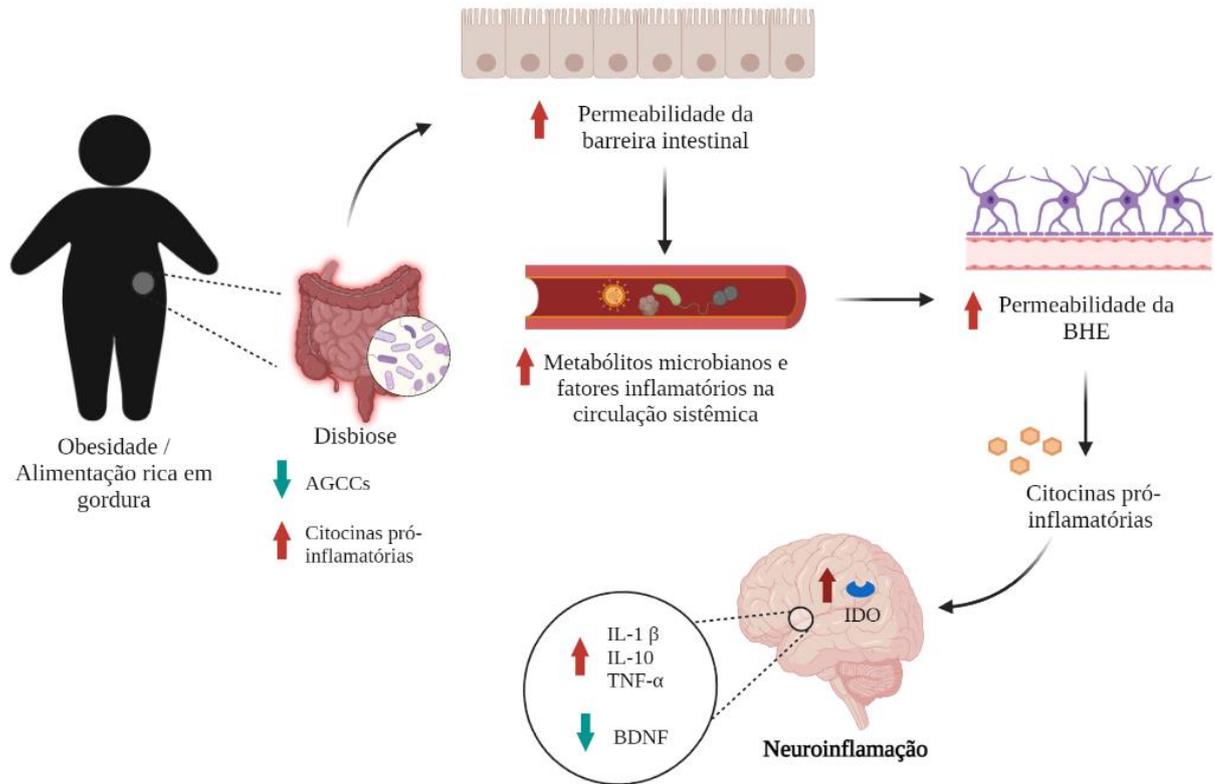
Existe uma grande concentração de células do TGI no sistema imunológico, as quais estão em constante comunicação com os microrganismos que habitam o intestino humano. É na interface entre a camada de muco e as células epiteliais que ocorre a interação hospedeiro-microbiota (CRYAN et al., 2019). A disbiose e/ou a ingestão de dietas hipercalóricas pode

promover o aumento da permeabilidade da barreira intestinal, permitindo que bactérias e seus produtos metabólicos possam chegar até a circulação periférica e causar uma resposta inflamatória sistêmica através da liberação das citocinas pró-inflamatórias. O estado inflamatório pode alterar a permeabilidade da BHE e induzir neuroinflamação (ROY SARKAR; BANERJEE, 2019) (Figura 1).

A microbiota intestinal é capaz de influenciar nos mais diversos comportamentos do indivíduo, desde o comportamento sexual, social, aprendizado, memória e estresse, até a alimentação e a obesidade, atuando sobre o sistema neuroendócrino, principalmente no eixo HPA (CUSSOTTO et al., 2018). A hiperativação desse eixo, que ocorre no estresse crônico, resulta em uma liberação constante e não adaptativa de cortisol (MILANESCHI et al., 2018), e a longo prazo pode causar danos e perdas de células neuronais em regiões cerebrais associadas à depressão, como o hipocampo (SCHMAAL et al., 2016). Ressalta-se ainda pesquisas que demonstram que a hiperativação do eixo HPA também é muito comum em pessoas obesas (KOLBE; DUMBELL; OSTER, 2015; PUTIGNANO et al., 2003; WESTER et al., 2014).

A exposição crônica ao cortisol pode induzir à obesidade de diferentes formas: aumento do apetite com preferência por alimentos energéticos, promovendo adipogênese e hipertrofia principalmente na gordura visceral, entre outros (FARDET; FÈVE, 2014). O estado de inflamação crônica observado na obesidade pode afetar o funcionamento dos receptores de glicocorticoides no hipocampo, local de ligação do cortisol e que dá início ao feedback negativo para suprimir a atividade do eixo HPA. Esse é um mecanismo que está intimamente relacionado com a via imunológica e representa uma conexão em potencial entre a depressão e a obesidade.

**Figura 1** - Relação entre microbiota intestinal e neuroinflamação



Esquema ilustrando a interação entre as alterações na microbiota intestinal e a indução e/ou potencialização da neuroinflamação. AGCCs: ácidos graxos de cadeia curta; BHE: barreira hematoencefálica; IDO: indolamina 2,3-dioxigenase; IL: interleucina (1 $\beta$ ) e (10); TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa; BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro. **Fonte:** autoria própria.

## 2.4. PREBIÓTICOS, MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL E SAÚDE

Os prebióticos são fibras provenientes da dieta alimentar não digeríveis pelas enzimas do TGI humano, e que beneficiam a saúde do hospedeiro aumentando a atividade de microrganismos intestinais, especialmente *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (PANDEY; NAIK; VAKIL, 2015). São naturalmente encontrados em alimentos como aspargos, alho, cebola, feijão, bananas, tomate, mel e outros (VARZAKAS et al., 2018). Devido a sua baixa concentração nesses alimentos, os prebióticos são produzidos industrialmente através do uso de lactose, sucrose e amido como matéria-prima.

As propriedades benéficas à saúde associadas a administração dos prebióticos envolvem inibição de patógenos no sistema gastrointestinal, modulação do sistema imune, diminuição dos níveis séricos de lipídios e produção de metabólitos que influenciam na função cerebral, diminuindo a permeabilidade da BHE e a neuroinflamação (GIBSON et al., 2017).

Os prebióticos atuam como substratos para a microbiota intestinal e dessa forma são capazes de modular a composição desses microrganismos. A fermentação dessas fibras origina produtos benéficos, em sua maioria ácidos, com pH em torno de 6,5 a 5,5, contribuindo para a alteração populacional da microbiota intestinal (DUNCAN et al., 2009). Torna-se importante ressaltar que a acidificação intracelular pode modificar a via de sinalização de cálcio, a liberação de neurotransmissores e reduzir a permeabilidade celular da barreira intestinal por meio da transcrição de proteínas das junções comunicantes, possivelmente alterando também a comunicação e o comportamento neuronal (MIRZAEI et al., 2021).

Os produtos da degradação dos prebióticos são principalmente os AGCCs, como butirato, acetato e propionato, e possuem atividades importantes não apenas no TGI, mas para o organismo como um todo (SUN et al., 2017). Localmente, esses metabólitos contribuem para a integridade do epitélio intestinal, estimulam a produção de muco, modulam a motilidade gástrica e estão envolvidos nos efeitos anti-inflamatórios, como inativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e promoção das células T reguladoras (Tregs) (FURUSAWA et al., 2013; USAMI et al., 2008). Além de induzir a liberação de hormônios e neuropeptídeos, como o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) e o peptídeo YY (PYY) pelas células enteroendócrinas intestinais, causando saciedade (SAVIGNAC et al., 2016).

Interessantemente, pesquisas têm demonstrado que o butirato pode diminuir o nível de gordura nos adipócitos, aumentando a sensibilidade hormonal à leptina e a atividade enzimática da lipase (HEIMANN et al., 2016; LIN et al., 2012). Assim, além da redução do apetite, a composição corporal também é afetada pela redução do acúmulo de gordura e do peso corporal (WANG et al., 2019). De maneira geral, os AGCCs estão entre os metabólitos que exercem grande influência no organismo humano.

Uma parte dos AGCCs circulantes pode alcançar o SNC e afetar a função cerebral. Estudos mostram que esses carboidratos parecem ser um fator crucial para a maturação e o desempenho funcional da micróglia, células do SNC que seriam correspondentes aos macrófagos. Somado ao seu papel imunológico, a micróglia é importante para a formação de circuitos neurais no cérebro em desenvolvimento, o que significa que a sua função depende da microbiota e pode influenciar nos circuitos que regulam o eixo HPA (BILIMORIA; STEVENS, 2015; ERNY et al., 2015). Estudos pré-clínicos como o de Burokas et al. (2017) e Mika et al. (2018) demonstram que os prebióticos são capazes de diminuir a concentração plasmática do cortisol e corticosterona, além de atenuar a atividade em regiões cerebrais envolvidas com o comportamento ansioso, como a amígdala.

Algumas bactérias ainda são capazes de sintetizar neurotransmissores e neuromoduladores, como o ácido gama-aminobutírico (GABA), noradrenalina, 5-hidroxitriptamina (5-HT), dopamina e acetilcolina, que atuam na regulação da função cerebral e influenciam o comportamento do hospedeiro (LYTE, 2011; MAZZOLI; PESSIONE, 2016). Embora esses neurotransmissores bacterianos possivelmente exerçam efeitos locais, ainda se faz necessário maiores esclarecimentos sobre como sua ação influencia no eixo intestino-cérebro.

### **3. JUSTIFICATIVA**

O índice relacionado à obesidade e suas comorbidades aumentaram em todo o mundo nos últimos 20 anos, principalmente devido ao consumo excessivo de alimentos ultraprocessados e dietas hipercalóricas. No Brasil, essa condição crônica aumentou 72% nos últimos treze anos, saindo de 11,8% em 2006 para 20,3% em 2019, segundo dados da Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (Abeso). Esses números aumentaram devido à pandemia da Covid-19, uma vez que o isolamento social de meses contribuiu para a má alimentação e provocando aumento dos casos de depressão. Dessa forma, vários estudos apontam evidências da relação entre o consumo de dietas ricas em gordura e alterações de humor. Evidências crescentes sugerem que o eixo intestino-cérebro possui importante papel na integridade e no funcionamento fisiológico do cérebro. A microbiota intestinal compreende um fator crucial entre o eixo intestino-cérebro e é afetada por diferentes fatores como, idade, sexo, ingestão de antibióticos e alimentação. A manutenção do seu equilíbrio contribui para o neurodesenvolvimento e a homeostase do organismo. A avaliação dos prebióticos em modelos animais de depressão vem demonstrando resultados promissores, porém, a sua atuação em modelos de depressão comórbida à obesidade ainda é pouco investigada.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos dos prebióticos fruto-oligossacarídeo (FOS) e galacto-oligossacarídeo (GOS) sobre a neuroinflamação e depressão em modelo animal de obesidade induzido por dieta em camundongos C57Bl/6 *wild type*.

#### **4.2 Objetivos Específicos**

Em modelo animal de obesidade, avaliar a ação de FOS e GOS sobre:

- a) o comportamento depressivo em camundongos;
- b) as vias de sinalização na neuroinflamação;
- c) o metabolismo lipídico e o perfil glicêmico;
- d) a expressão de marcadores da plasticidade sináptica no hipocampo e córtex pré-frontal.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Desenho do estudo

O delineamento experimental deste estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA 135/2018 IAM/FIOCRUZ). A indução da obesidade foi realizada durante todas as 18 semanas do experimento e nas últimas seis semanas realizou-se o tratamento. Foram utilizados 60 camundongos machos C57BL/6 *Wild-type*, adultos jovens (8-10 semanas), distribuídos nos seguintes grupos (n=15):

**Controle:** O grupo recebeu dieta padrão (PragSoluções - AIN-93G) durante todo o período experimental;

**HFD:** O grupo recebeu dieta rica em gordura (60% de gordura) (PragSoluções - AIN-93M);

**HFD + FLUOXETINA:** O grupo recebeu dieta HFD durante 18 semanas e nas últimas seis semanas foi administrado a Fluoxetina (Sigma-Aldrich - 10 mg/kg/dia) diluída em água para beber *ad libitum*;

**HFD + FOS + B-GOS (Bimuno®-Galactooligossacarídeo):** O grupo recebeu dieta HFD durante 18 semanas e nas últimas seis semanas foram administrados os prebióticos (0,3g e 0,4g / camundongo / dia de FOS e GOS respectivamente) diluídos em água para beber *ad libitum*;

O peso corporal dos animais foi avaliado antes e depois do tratamento. Na última semana do experimento foram realizados os testes comportamentais e em seguida, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal (i.p.) de ketamina (115 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e eutanasiados. Amostras de sangue venoso foram coletadas por punção cardíaca e o córtex pré-frontal e o hipocampo foram coletados para análises posteriores.

## 5.2 Administração dos Prebióticos e Fluoxetina

Os prebióticos FOS e GOS foram dissolvidos diariamente na água de beber *ad libitum* nas concentrações de 0,3g e 0,4g/camundongo/dia, nas últimas seis semanas experimentais (Burokas et al., 2017). O cloridrato de fluoxetina (Sigma-Aldrich) foi administrado de forma semelhante aos prebióticos na concentração de 10mg/kg/dia nas últimas 6 semanas de experimento.

## 5.3 Avaliação do perfil lipídico

Após a formação do coágulo, as amostras de sangue foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos para separação do soro e dosagem do perfil lipídico (colesterol total e triglicerídios) e glicose através do método espectrofotométrico no aparelho Integra 400 – Roche.

## 5.4 Ensaio comportamentais

Os testes comportamentais realizados antes e depois do tratamento foram:

- 1) Teste de *splash*/respingo de sacarose (anedonia): Foi realizado conforme descrito por Lieberknecht et al., 2017. Resumidamente, os camundongos foram borrifados três vezes na parte superior das costas com uma solução de sacarose a 10% a uma distância de aproximadamente 5 cm do observador. Em seguida, os camundongos foram colocados em uma gaiola nova, vazia e limpa. O tempo de latência para *grooming* (auto-limpeza) e o tempo total de *grooming* foram analisados durante 5 minutos. Em seguida, a gaiola foi limpa com álcool a 10% para remover quaisquer indícios de odor deixados e o procedimento foi repetido com um novo camundongo.
- 2) Teste do nado forçado: Os camundongos foram colocados individualmente em um cilindro de acrílico (25cm altura, 10 cm de diâmetro e 8 cm de profundidade) contendo água a 25 °C. O tempo de imobilidade foi registrado durante 6 minutos, descartando-se o primeiro minuto que é para ambientação do animal. Quanto maior o tempo de imobilidade observado, menor é a motivação do animal em escapar, representando, portanto, um comportamento depressivo (Porsolt et al.,1977).
- 3) Suspensão da cauda: - os camundongos foram colocados de cabeça para baixo, cerca de 40 cm acima do chão, colocando-se fita adesiva a 1 cm da ponta da cauda em uma posição que não

possa escapar ou se segurar nas superfícies próximas. Foi considerado como critério de imobilidade quando o animal permaneceu imóvel e seu corpo esteve suspenso verticalmente. O tempo de imobilidade foi contabilizado nos últimos 5 minutos do teste (um total de 6 minutos), descartando-se o primeiro minuto de ambientação do animal.

### **5.5 Imunofluorescência para marcador da plasticidade sináptica (BDNF)**

Cortes congelados ou de parafina do hipocampo foram incubados com um tampão de bloqueio (1 × PBS / 5% de soro normal de cabra / 0,3% Triton X-100) durante 1h. Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-BDNF durante a noite no tampão de diluição de anticorpo (1 × PBS / 1% de BSA / 0,3% de Triton X-100) a 4 °C. Na sequência, foram incubados com um anticorpo secundário fluorescente (Vector Laboratories) durante 2 h, e 6-diamidino-2- fenilindole (DAPI, Invitrogen) durante 30 minutos, no escuro, para revelação da reação.

### **5.6 Análise por Imuno-histoquímica dos marcadores de inflamação (GFAP, Iba-1, TNF- $\alpha$ e COX-2) e sobrevivência celular (NeuN)**

Os cortes em parafina (5  $\mu$ m) do hipocampo e córtex pré-frontal foram incubados em BSA 1% por 1h e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% por 30 min. Foi feito o pré-tratamento dos cortes com tampão citrato a 20 mM, pH 6,0 à 100°C por 30 min. Em seguida, foram incubados com anticorpos primários monoclonais ou policlonais, overnight, à 4°C e por 1 h com anticorpo secundário IgG, conjugado com biotina. A reação imunohistoquímica foi amplificada usando o Kit Dako LSAB+System-HRP e revelada com 3'-3-diaminobenzidina (DAB). A avaliação foi realizada comparando a intensidade da marcação entre os grupos controle e tratado, com o programa NIH ImageJ.

### **5.7 Análise da expressão proteica de marcadores da inflamação (TLR4 e p-p38), da junção celular (ZO-1) e sobrevivência celular (NeuN).**

Os animais foram eutanasiados e o hipocampo e o córtex pré- frontal foram rapidamente removidos e congelados até o uso. As proteínas do homogenato desses tecidos (20 mg) foram separadas em géis de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio por eletroforese e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad, CA, USA). Após bloqueio overnight (5% de

leite desnatado), as membranas foram incubadas por três horas com os anticorpos primários. Posteriormente foi colocado o anticorpo secundário IgG conjugado com HRP (1:800 ou 1:1600, Sigma) diluídos em 1% de leite durante 1 h. A análise densitométrica dos níveis de proteína foi realizada pelo software NIH ImageJ.

### **5.8 Análise estatística**

Os grupos foram comparados pelo teste de variância de uma via (ANOVA-one way), seguido por pós-teste de Dunnet, para comparações múltiplas, utilizando o programa GraphPad Prism (San Diego, CA, USA). A comparação entre dois grupos experimentais foi baseada no test t de student. Foram consideradas significativas as diferenças com  $p < 0,05$ . Os dados foram apresentados como a média  $\pm$  desvio-padrão.

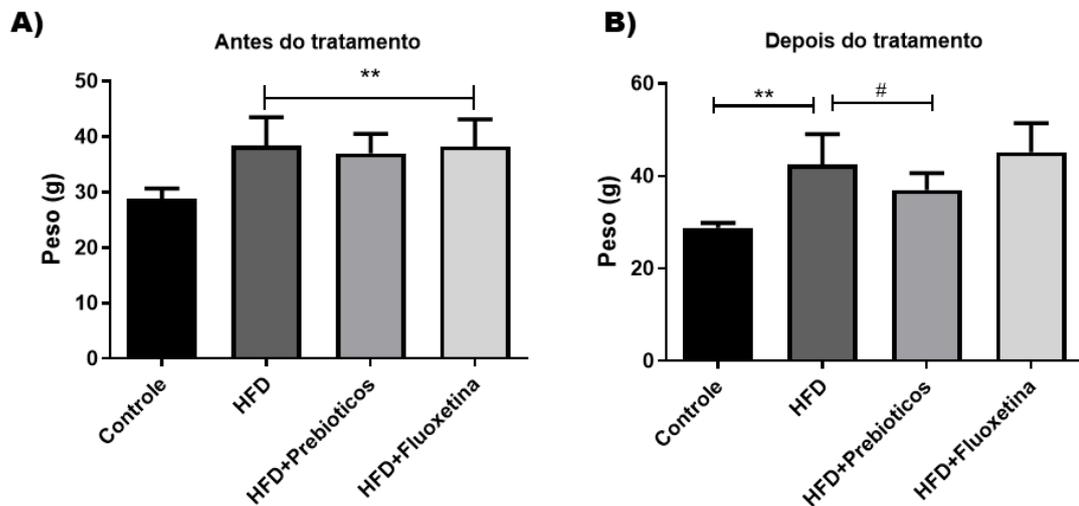
## **6. RESULTADOS**

### **6.1 Análise do peso corporal**

O peso corporal dos animais foi acompanhado semanalmente durante todo o período experimental e os resultados estão presentes nos gráficos da Figura 2.

No período anterior ao tratamento os grupos que receberam dieta HFD apresentaram ganho de peso quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Gráfico A – Figura 2). Após o tratamento, o grupo HFD apresentou aumento de peso quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). O tratamento com prebióticos reduziu significativamente o peso dos animais quando comparado ao grupo HFD ( $p < 0,05$ ). Por sua vez, o grupo HFD + Fluoxetina não apresentou diferença significativa quando comparado aos demais (Gráfico B – Figura 2).

**Figura 2** - Acompanhamento do peso corporal



ANOVA: # $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ .

## 6.2 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados antes e após o período de tratamento dos animais para verificar o efeito dos prebióticos FOS e GOS.

O teste de respingo de sacarose (*splash test*) foi utilizado para avaliar anedonia, estímulo relacionado ao autocuidado e comportamento motivacional nos animais. Os gráficos A e B presentes na Figura 3 mostram os resultados desse teste.

A análise realizada aponta que antes do tratamento com prebióticos ou fluoxetina, o grupo controle apresentou melhor desempenho quando comparado aos demais ( $p < 0,01$ ) (Gráfico A – Figura 3). Porém, após o tratamento, houve diferença estatística significativa entre os grupos controle e HFD ( $p < 0,01$ ), HFD e HFD + Prebióticos ( $p < 0,05$ ) e entre os animais dos grupos HFD e HFD + Fluoxetina ( $p < 0,05$ ) (Gráfico B – Figura 3), o que indica que o tratamento com prebióticos preveniu o surgimento do comportamento de anedonia.

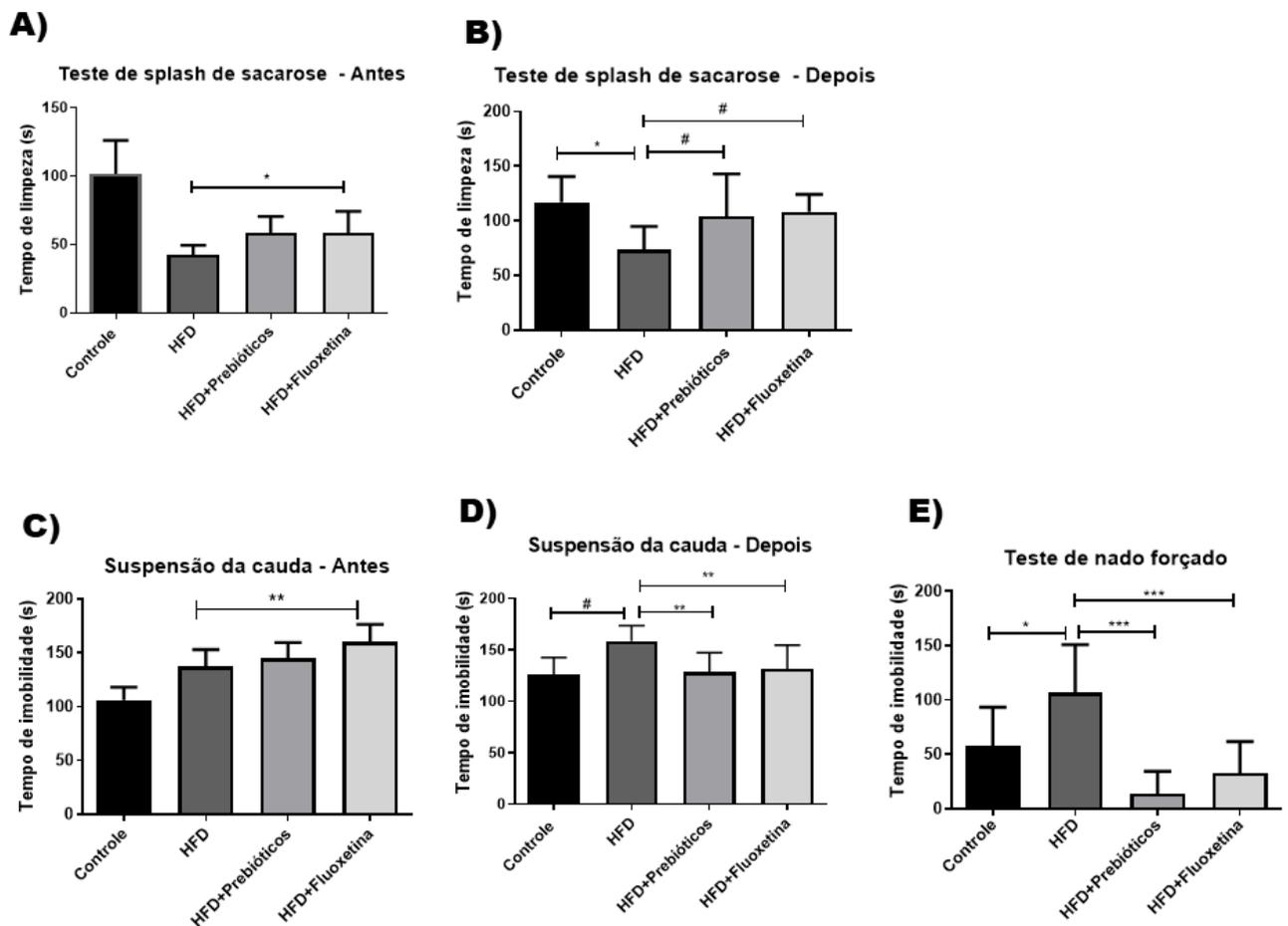
O teste de suspensão em cauda foi realizado para avaliar os efeitos antidepressivos nos animais e os resultados encontram-se nos gráficos C e D da Figura 3.

Antes de receberem os tratamentos com os prebióticos ou a fluoxetina, os animais apresentaram maior tempo de imobilidade quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Gráfico C – Figura 3). No entanto, após o período de tratamento foi possível perceber que houve diferença estatística entre os grupos HFD e controle ( $p < 0,05$ ), bem como entre os grupos HFD e HFD + Fluoxetina ( $p < 0,001$ ). Os camundongos que receberam o tratamento com FOS e GOS também demonstraram redução do tempo de imobilidade de maneira estatisticamente

significativa quando comparados ao grupo HFD ( $p < 0,001$ ), sendo isto interpretado como uma melhora do comportamento depressivo (Gráfico D – Figura 3).

A partir do teste de nado forçado (Gráfico E – Figura 3), que avalia o comportamento do tipo depressivo nos animais, observou-se que houve um aumento do tempo de imobilidade significativa do grupo HFD quando comparado com o grupo controle ( $p < 0,01$ ). Por sua vez, os prebióticos reduziram o tempo de imobilidade quando comparado aos animais do grupo HFD ( $p < 0,0001$ ) e o mesmo também foi visto para os animais tratados com o antidepressivo fluoxetina ( $p < 0,0001$ ).

**Figura 3** - Testes comportamentais



ANOVA: # $p < 0,05$ ; \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ .

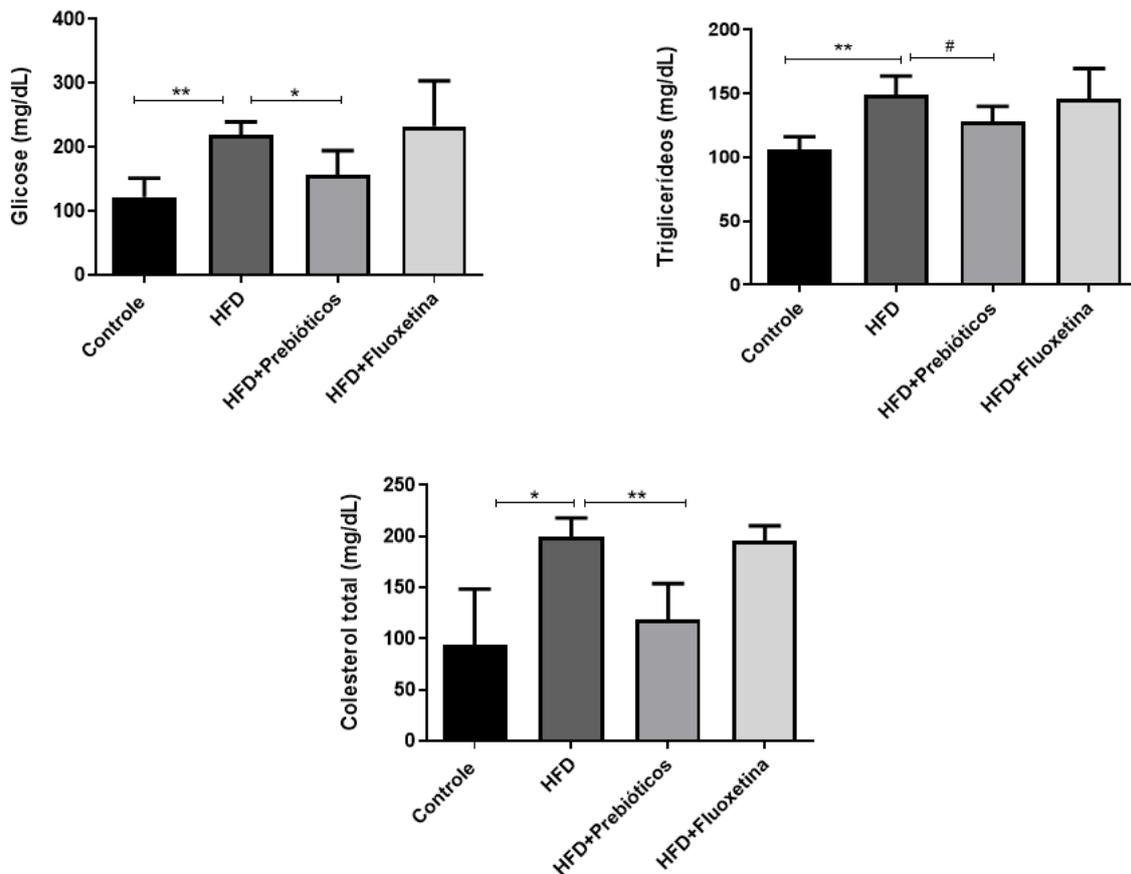
### 6.3 Perfil bioquímico

Para os três indicadores bioquímicos avaliados (glicose, triglicerídeos e colesterol total), apresentados na Figura 4, houve diferença significativa entre os grupos controle e HFD ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,01$ , respectivamente).

Com relação aos níveis de glicose, o grupo HFD apresentou diferença estatística comparado ao grupo controle ( $p < 0,001$ ) e aos animais do grupo HFD + Prebióticos ( $p < 0,01$ ). O tratamento com fluoxetina não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo HFD.

A administração dos prebióticos também diminuiu de maneira significativa os níveis séricos de triglicerídeos ( $p < 0,05$ ) e colesterol total ( $p < 0,001$ ) quando comparados ao grupo HFD. Já os animais que receberam o tratamento com a fluoxetina não apresentaram diferença estatística significativa no perfil lipídico quando comparado ao grupo HFD. Com relação aos níveis de glicose, o grupo HFD apresentou diferença estatística comparado ao grupo controle ( $p < 0,001$ ) e aos animais do grupo HFD + Prebióticos ( $p < 0,01$ ). O tratamento com fluoxetina não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo HFD.

**Figura 4** - Avaliação dos parâmetros bioquímicos

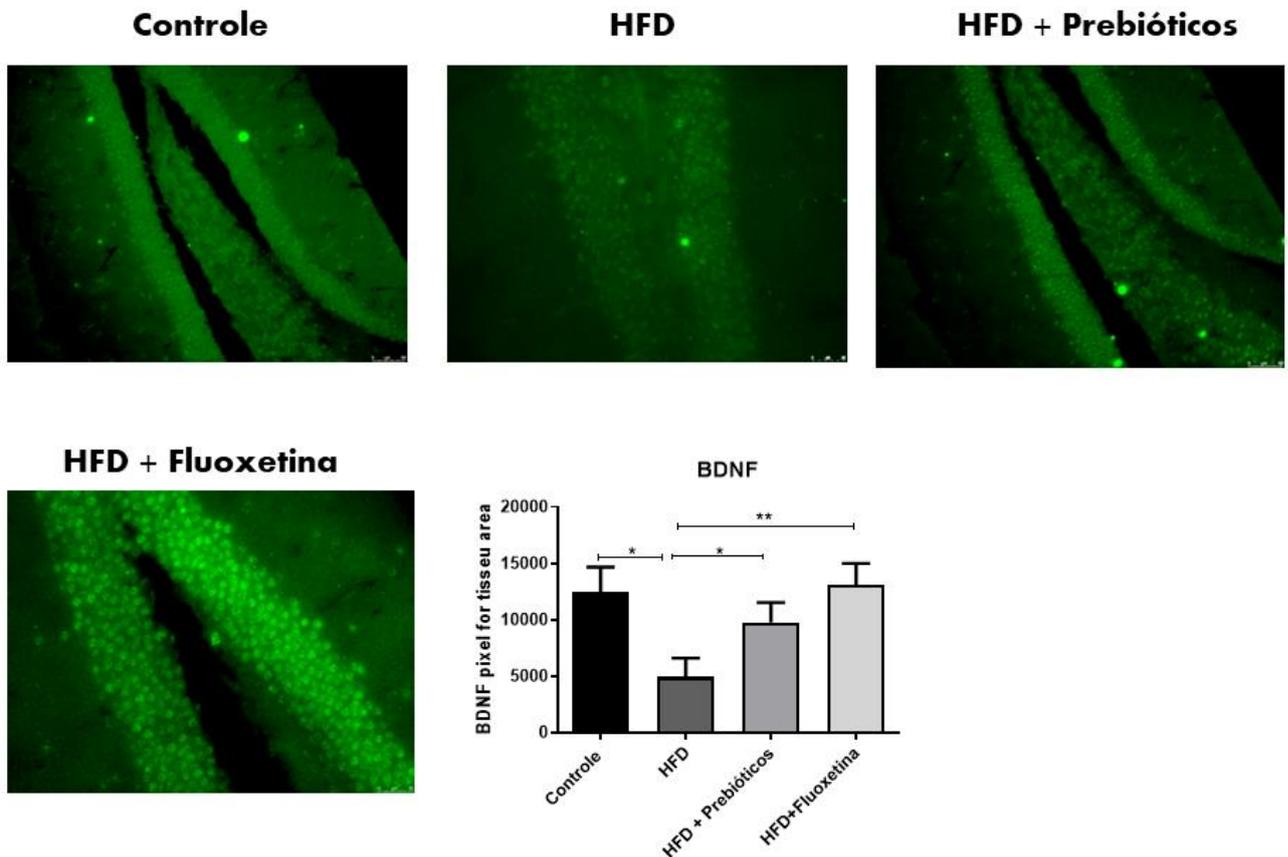


ANOVA: # $p < 0,05$ ; \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ .

#### 6.4 Imunofluorescência e Imuno-histoquímica

Para analisar o efeito da dieta HFD e a possível ação dos prebióticos FOS e GOS na plasticidade sináptica do cérebro, foi realizada imunofluorescência de BDNF na região do hipocampo (Figura 5). Os animais do grupo HFD apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa da expressão de BDNF quando comparado aos grupos controle ( $p < 0,01$ ), HFD + Prebióticos ( $p < 0,01$ ) e HFD + Fluoxetina ( $p < 0,001$ ). Esses resultados indicam que o tratamento com FOS e GOS foi capaz de reverter os efeitos negativos provenientes da dieta HFD sobre a plasticidade sináptica no hipocampo.

Figura 5 - Imunofluorescência de BDNF no hipocampo



ANOVA: \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ .

Através da técnica de imuno-histoquímica foi possível analisar o efeito dos prebióticos na expressão dos marcadores da inflamação TNF- $\alpha$ , ciclooxigenase (COX) -2, Iba-1 e GFAP e do marcador de sobrevivência celular Neu-N nas regiões do hipocampo e córtex pré-frontal.

A Figura 6 apresenta os resultados observados para o TNF- $\alpha$  no hipocampo. O grupo HFD apresentou aumento significativo da citocina inflamatória quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ). A administração de FOS e GOS pareceu reverter esse efeito, resultando na diminuição da expressão de TNF- $\alpha$  quando comparado ao grupo HFD ( $p < 0,0001$ ). Resultado semelhante foi obtido entre os animais do grupo HFD e aqueles que foram tratados com a fluoxetina ( $p < 0,0001$ ).

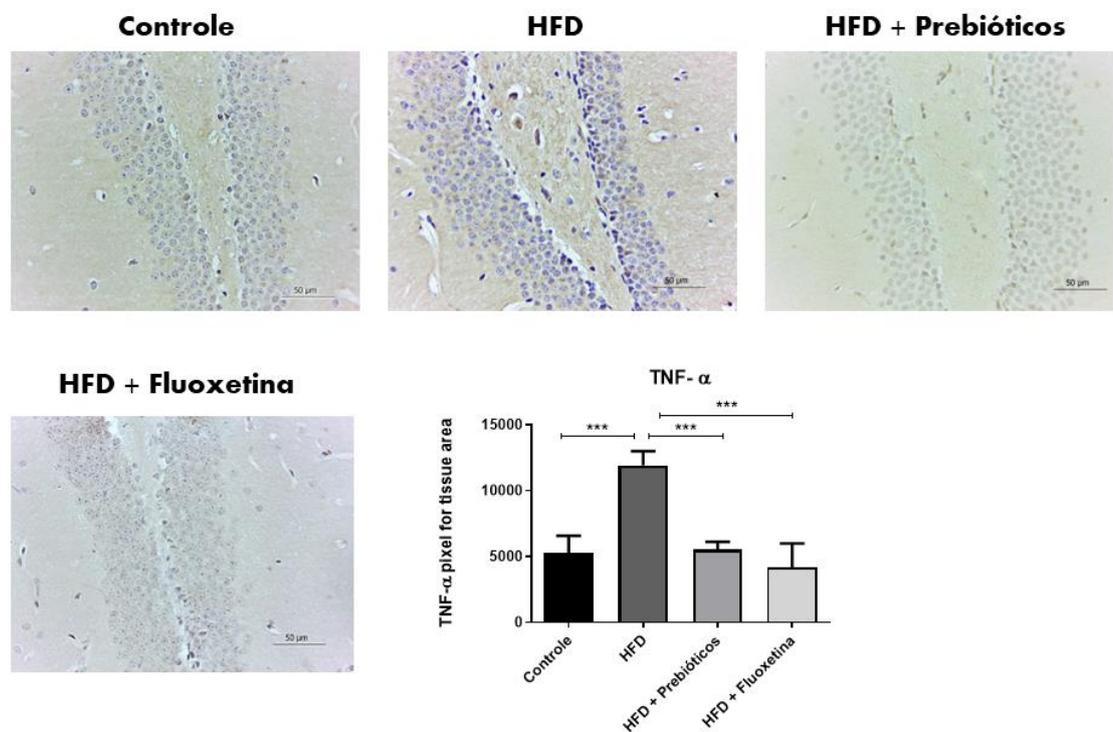
A análise da expressão cerebral da enzima COX-2 foi realizada no hipocampo (Figura 7A) e no córtex pré-frontal (Figura 7B). Os animais que receberam dieta HFD demonstraram aumento significativo em ambas as regiões analisadas quando comparados ao grupo controle (Gráficos C e D – Figura 7:  $p < 0,001$ ;  $p < 0,0001$ ). Os camundongos tratados com FOS e GOS apresentaram diminuição da expressão de COX-2 tanto no hipocampo (Gráfico C – Figura 7:  $p < 0,001$ ) quanto no córtex pré-frontal (Gráfico D – Figura 7:  $p < 0,0001$ ) quando comparados ao grupo HFD. Os animais que receberam a fluoxetina como tratamento também apresentaram diminuição estatisticamente significativa da expressão proteica (Gráficos C e D – Figura 7:  $p < 0,001$ ;  $p < 0,01$ ).

A expressão da proteína Iba-1, marcador de micróglia, no hipocampo e no córtex pré-frontal está representada na Figura 8. A imuno-histoquímica para essa molécula demonstrou que os animais do grupo HFD apresentaram aumento estatisticamente significativo da sua expressão quando comparado ao grupo controle tanto no hipocampo como no córtex pré-frontal (respectivamente, Gráficos C e D – Figura 8:  $p < 0,0001$ ). Em contrapartida, o tratamento com os prebióticos foi capaz de diminuir a expressão desse marcador inflamatório quando comparado ao grupo HFD (Gráficos C e D – Figura 8:  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ). Resposta semelhante pôde ser visualizada nos animais tratados com a fluoxetina quando comparados aos não tratados (Gráficos C e D – Figura 8:  $p < 0,01$ ).

A proteína glial fibrilar ácida ou GFAP é utilizada como marcador para identificação histológica de astrócitos normais e em situações patológicas. A Figura 9 mostra os resultados da imuno-histoquímica para GFAP também no hipocampo e no córtex pré-frontal (Figura 9A e 9B, respectivamente). Foi visto que nas duas regiões analisadas a expressão de GFAP foi estatisticamente maior no grupo HFD quando comparado ao grupo controle (Gráficos C e D – Figura 9:  $p < 0,0001$ ). A administração de FOS e GOS promoveu uma diminuição significativa da expressão do marcador quando comparado ao grupo HFD (Gráficos C e D – Figura 9:  $p < 0,001$ ). O tratamento com a fluoxetina apresentou resultados semelhantes no hipocampo (Gráfico C – Figura 9:  $p < 0,001$ ) e no córtex pré-frontal (Gráfico D – Figura 9:  $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo não tratado.

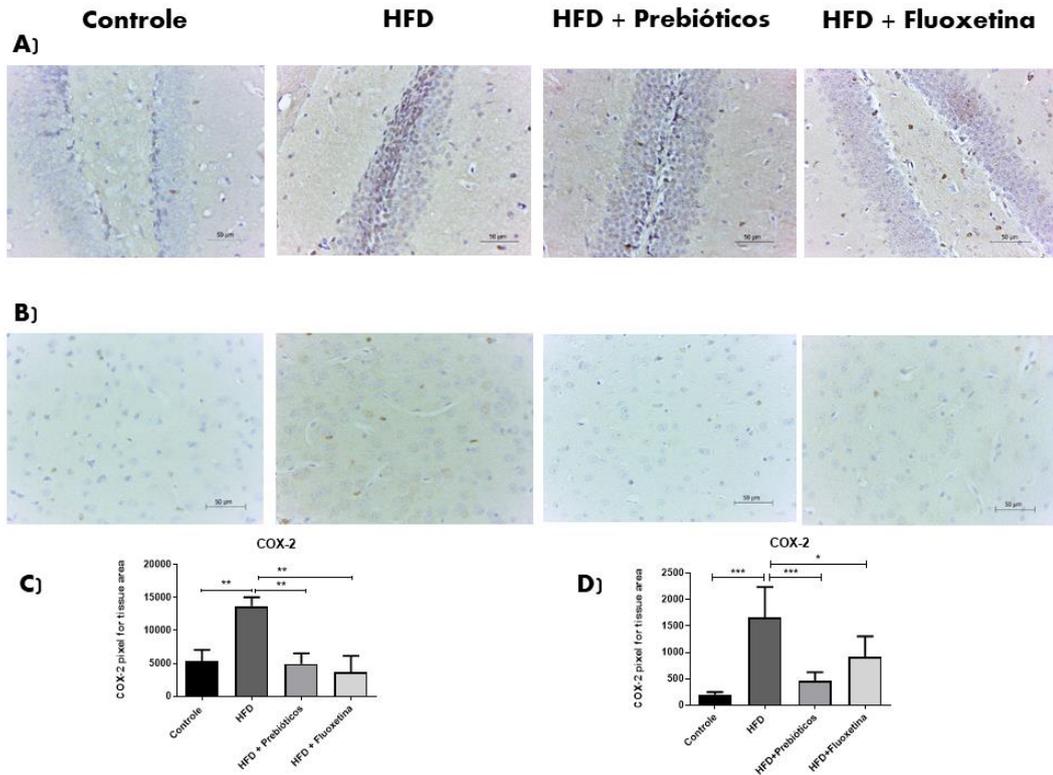
Como marcador de sobrevivência celular, os resultados da imuno-histoquímica para a proteína NeuN na região do hipocampo estão presentes na Figura 10. Foi observado que os animais do grupo HFD apresentaram diminuição significativa da expressão para NeuN quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). O tratamento com os prebióticos aumentou a expressão dessa proteína no hipocampo de forma estatisticamente significativa ao comparar com o grupo HFD ( $p < 0,05$ ). Os camundongos que receberam a fluoxetina como tratamento também apresentaram resultado semelhante quando comparados ao grupo não tratado ( $p < 0,05$ ).

**Figura 6** - Imuno-histoquímica de TNF- $\alpha$  no hipocampo



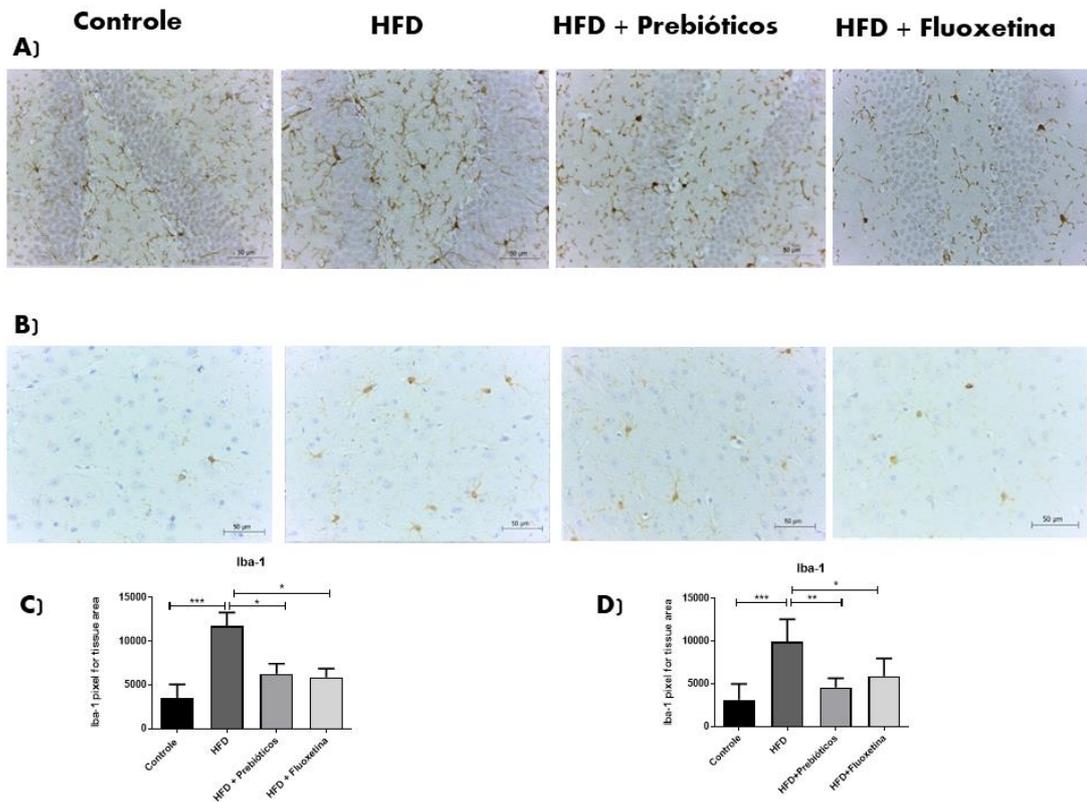
ANOVA: \*\*\*  $p < 0,0001$ .

**Figura 7** - Imuno-histoquímica de COX-2 no hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B)



ANOVA: \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

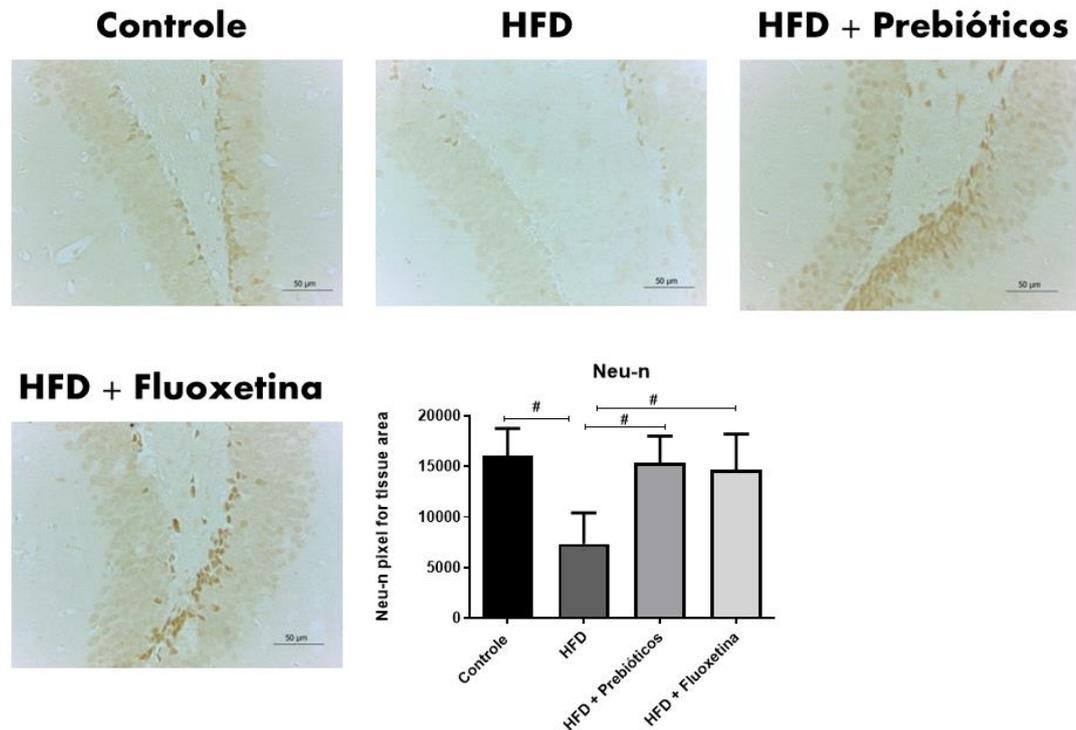
**Figura 8** - Imuno-histoquímica de Iba-1 no hipocampo (A) e córtex pré-frontal (B)



ANOVA: \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .



**Figura 10** - Imuno-histoquímica de Neu-N no hipocampo



ANOVA: #p < 0,05.

### 6.5 Western Blotting

O *Western Blotting* foi realizado utilizando a região do hipocampo com o objetivo de verificar a expressão de marcadores envolvidos no processo de neuroinflamação, como o receptor Toll-Like 4 (TLR4), a proteína de junção zona ocludina (ZO-1), p38 fosforilada (p-p38) e NeuN.

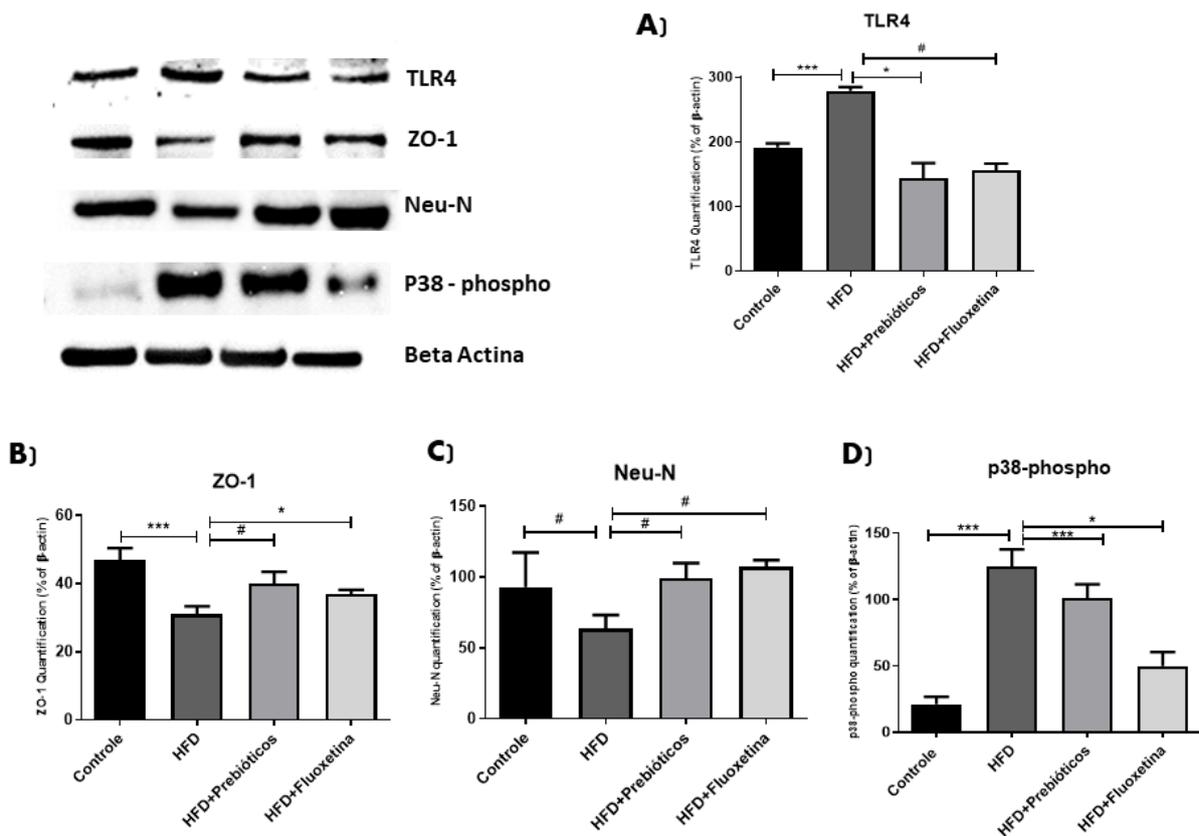
O TLR4 (Figura 11 – Gráfico A) apresentou níveis aumentados nos animais que receberam dieta HFD quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ). Já os animais tratados com os prebióticos demonstraram diminuição significativa da expressão desse receptor quando comparado aos animais do grupo HFD ( $p < 0,01$ ). Resultado similar foi visualizado para o grupo tratado com a fluoxetina, que resultou em níveis menores da expressão de TLR4 em comparação ao grupo HFD ( $p < 0,05$ ).

A proteína de junção ZO-1 (Figura 11 – Gráfico B), relacionada com a integridade da barreira hematoencefálica, apresentou diminuição estisticamente significativa no grupo HFD quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ). A administração de FOS e GOS parece ser capaz de reverter esse quadro, aumentando a expressão da proteína no tecido ( $p < 0,05$ ). O tratamento com a fluoxetina também demonstrou aumento significativo quando comparado ao grupo HFD ( $p < 0,01$ ).

Para o marcador NeuN (Figura 11 – Gráfico C), os resultados obtidos no *Western Blotting* estão em concordância com aqueles vistos na imuno-histoquímica. O grupo HFD demonstrou diminuição significativa da proteína quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Nos camudongos tratados com FOS e GOS houve aumento significativo da expressão de NeuN em comparação ao grupo não tratado ( $p < 0,05$ ). E o mesmo foi observado para os animais que receberam fluoxetina ( $p < 0,05$ ).

A proteína p-p38 está envolvida em uma via de sinalização que contribui para a produção e liberação de citocinas. O grupo HFD apresentou aumento da expressão de p-p38 estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ). Foi observada uma diminuição da expressão proteica nos animais tratados com os prebióticos ( $p < 0,0001$ ), bem como naqueles tratados com a fluoxetina ( $p < 0,01$ ) (Figura 11 – Gráfico D).

**Figura 11** - Expressão de proteínas no hipocampo através de *Western Blotting*



ANOVA: # $p < 0,05$ ; \* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

## 7. DISCUSSÃO

Caracterizada por um estado inflamatório crônico de baixo grau que se origina principalmente no tecido adiposo e que envolve a microbiota intestinal, a obesidade é atualmente considerada não apenas um distúrbio metabólico, mas também uma condição inflamatória que afeta os sistemas imunológicos inato e adquirido (MCLAUGHLIN et al., 2017). Esse estado de inflamação observado em indivíduos obesos parece apresentar um importante papel para o desencadeamento de doenças como a depressão. Isso ocorre porque o processo inflamatório não se restringe apenas aos tecidos periféricos, mas é induzido também em diferentes regiões do cérebro, configurando o que se denomina por neuroinflamação (LIZARBE et al., 2019).

O consumo da dieta rica em gordura (*high fat diet*, HFD) tem sido analisado em modelo animal e associado ao desenvolvimento de comportamentos do tipo depressivo acompanhado de alteração da microbiota intestinal (HASSAN et al., 2019).

Em recente pesquisa, Seguella e colaboradores (2021) avaliaram o efeito da HFD em camundongos machos durante um período de 20 semanas e identificaram que os animais apresentaram aumento do peso corporal, o qual foi associado aos danos causados na mucosa duodenal caracterizada pela infiltração de células do sistema imune e diminuição da expressão das proteínas de junção ZO-1 e ocludina. Somado a isso, os autores também relataram que nos testes comportamentais de suspensão em cauda e nado forçado houve aumento do tempo de imobilidade do grupo HFD quando comparado ao grupo que recebeu dieta padrão.

No estudo realizado por Burokas e colaboradores (2017), a administração dos prebióticos FOS e GOS, em monoterapia ou terapia combinada, demonstrou ser capaz de diminuir o comportamento do tipo depressivo observado também nos testes de nado forçado e suspensão em cauda. Além disso, foi visto que a liberação de corticosterona foi diminuída nos camundongos tratados apenas com GOS e com a combinação FOS + GOS, o que seria indicativo de redução do estresse e, conseqüentemente, redução de citocinas pró-inflamatórias. As observações comportamentais também foram visualizadas por Zhang e colaboradores (2020) ao administrar FOS em camundongos submetidos a estresse crônico. Os animais que receberam esse prebiótico apresentaram melhor desempenho nos testes comportamentais. Os resultados obtidos no presente estudo confirmam os achados nas pesquisas mencionadas, indicando que os prebióticos FOS e GOS podem ajudar na melhora do comportamento do tipo depressivo em modelo animal de depressão comórbida à obesidade.

A administração dos prebióticos demonstrou, ainda, ser capaz de diminuir o ganho de peso corporal dos animais. Isso ocorre, em parte, devido a modulação da microbiota intestinal proveniente do uso desses carboidratos, o que resulta em maior presença dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Estudos mostram que essas alterações estão relacionadas à melhora da atividade celular entero-endócrina, à homeostase da glicose e à sensibilidade a leptina em camundongos obesos (CANI et al., 2009b; EVERARD et al., 2011). Além disso, os prebióticos também desempenham papel na redução da ingestão alimentar por aumentar a densidade de células que produzem o hormônio supressor do apetite (PYY) (BROOKS et al., 2016; LIU et al., 2019). Pesquisas que avaliam o efeito dos prebióticos sobre a ingestão de alimento em modelos de obesidade demonstram que os animais apresentam menor ganho de peso quando comparados com aqueles que não recebem o tratamento com esses carboidratos (CANI et al., 2009b; WANG et al., 2018).

A análise dos parâmetros metabólicos, glicose, triglicerídeos e colesterol total, apresentou uma redução significativa nos animais que receberam o tratamento com os prebióticos, indicando que FOS e GOS podem contribuir para melhoria das vias metabólicas da glicose e dos lipídios. Alguns estudos pré-clínicos apresentaram resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo. Wang e colaboradores (2018) mostraram que animais alimentados com dieta HFD e posteriormente tratados com o prebiótico manano-oligossacarídeo apresentaram aumento da depuração de glicose no sangue. Fato que foi relacionado a diminuição dos níveis transcricionais da leptina e adiponectina após a administração do prebiótico. A leptina ajuda a regular o balanço energético ao inibir a fome, enquanto a adiponectina pode ajudar a regular os níveis de glicose e a oxidação de ácidos graxos. Everard e colaboradores (2011) também demonstram em sua pesquisa a atuação dos prebióticos sobre essas vias metabólicas. Os camundongos obesos tratados com o prebiótico oligofrutose apresentaram níveis mais baixos de triglicerídeos e menor massa de tecido adiposo. Em outra pesquisa realizada por Respondek e colaboradores (2013), foi relatado o benefício da administração de FOS de cadeia curta sobre os metabólitos lipídicos no plasma e adicionalmente sobre a insulinemia em camundongos obesos induzidos por dieta.

As alterações da microbiota intestinal presentes em indivíduos obesos interferem na permeabilidade da barreira intestinal e, dessa forma, alguns metabólitos podem chegar até a circulação periférica e ativar respostas imunes. O aumento da produção e liberação de citocinas e metabólitos microbianos, por sua vez, podem alterar a permeabilidade da BHE e induzir neuroinflamação. No presente estudo, verificou-se que a zônula ocludina (ZO-1), proteína componente das junções da barreira intestinal, teve sua expressão diminuída nos animais

alimentados com dieta HFD, mas tal situação pôde ser revertida com a administração dos prebióticos. Ao avaliar alterações na permeabilidade intestinal de camundongos obesos e diabéticos, Cani e colaboradores (2009b) verificaram que os camundongos tratados com oligofrutose apresentaram aumento do mRNA para ocludina e ZO-1 no jejuno. Em uma pesquisa recente, Zhang e colaboradores (2020) avaliaram que o FOS se mostrou capaz de reverter as alterações da ZO-1 e demais proteínas de junção, além de reduzir citocinas pró-inflamatórias no cólon e no cérebro em modelo animal de depressão induzido por estresse.

O TLR4 é um receptor que possui um domínio extracelular capaz de reconhecer os metabólitos bacterianos, como o LPS, e desencadear uma cascata de sinalização que aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias (KÉRI; SZABÓ; KELEMEN, 2014). Um estudo que aponta essa relação é o de Khan e colaboradores (2018), em que a exposição de camundongos ao LPS levou a neuroinflamação através do aumento da expressão de TNF- $\alpha$ , COX-2 e IL-1 $\beta$  e aumentou a sinalização de TLR4 no córtex e no hipocampo quando comparados ao grupo controle. Mohyuddin e colaboradores (2021) mostraram em sua pesquisa que a administração oral de quito-oligossacarídeo (COS), um dos derivados da quitosana, na dose de 300-600 mg/kg/dia durante 7 dias em camundongos submetidos a estresse térmico, suprimiu a produção de TLR4, TNF- $\alpha$  e IL-10 no cólon.

Recentemente, os efeitos dos inibidores da COX-2 vêm sendo examinados para uso em ensaios clínicos, com resultados sugerindo a diminuição de danos cerebrais e morte neuronal. A hiperatividade enzimática da COX-2 estimula a produção de fatores pró-inflamatórios, desencadeando vias de sinalização que resulta em lesão cerebral (GLUSHAKOV et al., 2018). Nesse sentido, os inibidores dessa enzima podem exercer ações benéficas sobre a neuroinflamação visualizada em situações como a depressão.

No presente estudo, visualizou-se o aumento da expressão da COX-2 no córtex pré-frontal e no hipocampo dos animais do grupo HFD. Tal achado reforça resultados semelhantes vistos em outras pesquisas. Song e colaboradores (2021) observaram a superexpressão da enzima no hipocampo, mais especificamente no giro dentado, uma das principais regiões cerebrais associadas à depressão e outros transtornos psiquiátricos (GULYAEVA, 2018). Por meio da inibição da COX-2 com celecoxib, os pesquisadores verificaram que houve redução dos comportamentos do tipo depressivo nos animais. O efeito antidepressivo da inibição da COX-2 parece ser atribuído à diminuição do estresse oxidativo, fator que normalmente contribui para a neuroinflamação e a apoptose.

Vários estudos presentes na literatura demonstram como as dietas ricas em gordura influenciam nos níveis de BDNF, um importante fator de crescimento no SNC e periférico,

relacionado com o aprendizado e a memória (AGRIMI et al., 2019; ALKAN et al., 2021; MCALLAN et al., 2018). As dietas hipercalóricas podem causar inflamação neuronal no hipocampo, reduzindo as concentrações de BDNF e gerando consequências negativas para a neuroplasticidade e demais funções relacionadas a essa neurotrofina. A pesquisa realizada por Nazar e colaboradores (2021), ressaltou não apenas alterações na expressão proteica de BDNF, mas também a diminuição significativa da expressão gênica mRNA para NeuN. Esse resultado sugere que o estresse oxidativo e a inflamação crônica provenientes da dieta rica em gordura podem levar a maior morte de neurônios maduros. Os resultados encontrados no presente estudo confirmam tal relação. Burokas e colaboradores (2017) também evidenciaram o aumento da expressão gênica de BDNF no hipocampo de animais que receberam FOS e GOS em modelo de depressão induzida por estresse crônico.

Em nosso estudo foi demonstrado um aumento significativo dos marcadores de astrócito e micróglia, GFAP e Iba-1, respectivamente. Estudos presentes na literatura mostram que na região do hipotálamo em camundongos obesos ocorre astrogliose, uma inflamação dos astrócitos que é visualizada através de alterações morfológicas e fisiológicas. No hipocampo essas células desempenham papel importante na consolidação de informações e memória. A micróglia, por sua vez, são células do SNC equivalentes aos macrófagos, e realizam ações de defesa por fagocitose e são ativadas quando há lesões, infecções ou doenças neurodegenerativas (COLONNA; BUTOVSKY, 2017). Ambas as células contribuem criticamente para o processo inflamatório no SNC. Em condições adversas, a micróglia pode produzir espécies reativas de oxigênio (EROs), óxido nítrico (NO), proteases e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , que por sua vez, podem induzir apoptose neuronal. É importante ressaltar, porém, que em níveis fisiológicos, essas citocinas são importantes para a função neuronal, estimulando a liberação de fatores tróficos relacionados à neuroplasticidade e reparo, principalmente no hipocampo (BOWEN; DEMPSEY; VEMUGANTI, 2011).

Em conformidade com tais informações, o estudo de Li e colaboradores (2022) investigou os mecanismos inflamatórios envolvidos na depressão comórbida a obesidade induzida por dieta HFD em animais. Eles identificaram ativação dos astrócitos e da micróglia, aumento da neuroinflamação e diminuição nos níveis de BDNF no hipocampo. Em outra pesquisa, Yang e colaboradores (2018) demonstraram que a administração de Bimuno® galacto-oligossacarídeo (BGOS) por três semanas em ratos Sprague-Dawley submetidos à disfunção cognitiva pós-operatória, foi capaz de reduzir a expressão da micróglia ativada no hipocampo, visualizado a partir do marcador Iba-1. Somado a isso, o grupo tratado apresentou diminuição do fenótipo M1 da micróglia, envolvido com processos inflamatórios.

Os nossos resultados revelaram aumento da fosforilação da proteína p38 nos animais que receberam dieta HFD, sugerindo que a via de sinalização dessa quinase pode estar envolvida no processo de neuroinflamação, uma vez que se tratam de proteínas que respondem a situações de estresse, presença de citocinas e EROs. A fosforilação da p38 está associada a processos de necroptose e autofagia celular (YE, 2011). Outras evidências mostraram que a p38 pode desempenhar um papel importante na mediação de mudanças comportamentais na depressão (BAGANZ et al., 2015; FELGER et al., 2011). O estudo realizado por Xie e colaboradores (2021) em modelo animal de depressão induzida por lesão medular demonstrou aumento do nível de p38 fosforilada no hipocampo dos camundongos que apresentaram comportamento do tipo depressivo.

Os resultados apresentados, em conjunto, indicam que a administração dos prebióticos pode melhorar a barreira intestinal de animais submetidos a dieta hipercalórica através da modulação da microbiota e, por consequência, diminuir processos inflamatórios que possam alcançar o tecido cerebral.

## 8. CONCLUSÃO

As doenças que acometem o SNC são de grande complexidade, o que torna difícil alcançar métodos terapêuticos farmacológicos ou não que sejam eficientes em todos os indivíduos. Dada a importância da interação intestino-cérebro, percebe-se como a microbiota desempenha papel significativo nos processos inflamatórios presentes nas doenças crônicas, incluindo as de caráter neuropsiquiátricos, como a depressão.

Nos últimos anos, uma variedade de estudos aponta os prebióticos e os seus benefícios sobre a microbiota intestinal como possibilidades terapêuticas para as mais diversas condições. O presente estudo demonstrou como os prebióticos fruto-oligossacarídeo e galacto-oligossacarídeo puderam contribuir para a melhoria do comportamental no modelo de depressão comórbida a obesidade induzida por dieta, além de atuarem sobre os parâmetros bioquímicos que geralmente encontram-se alterados na obesidade.

A modulação da microbiota e a produção de metabólitos com capacidade anti-inflamatória obtidos a partir desses suplementos alimentares podem ter contribuído para a diminuição da expressão de marcadores da inflamação no hipocampo e no córtex pré-frontal, como a citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , a enzima COX-2 e as proteínas p-p38 e TLR4. FOS e GOS também foram importantes para aumentar a expressão de BDNF, neurotrofina envolvida com a manutenção e sobrevivência das células nervosas. O aumento da presença de Neu-N nos

animais tratados com os prebióticos fortalecem essa evidência. Foi visualizado diminuição da ativação dos astrócitos e da microglia, células que se encontram geralmente hiper expressas em situações patológicas que causam danos no SNC, demonstrando o provável efeito dos prebióticos sobre diversas vias para manutenção da fisiologia cerebral.

Sendo assim, conclui-se que os prebióticos apresentam propriedades importantes e que podem auxiliar no quadro inflamatório presente na depressão comórbida a obesidade induzida por dieta hipercalórica.

## 9. REFERÊNCIAS

ABESO – Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica. **Mapa da Obesidade**. São Paulo – SP. Disponível em: <https://abeso.org.br/obesidade-e-sindrome-metabolica/mapa-da-obesidade/>. Acesso em: 09 ago. 2022.

AGRIMI, J. et al. Obese mice exposed to psychosocial stress display cardiac and hippocampal dysfunction associated with local brain-derived neurotrophic factor depletion. **EBioMedicine**, v. 47, p. 384–401, 1 set. 2019.

ALBERT, P. R.; BENKELFAT, C.; DESCARRIES, L. The neurobiology of depression—revisiting the serotonin hypothesis. I. Cellular and molecular mechanisms. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1601, p. 2378, 9 set. 2012.

ALKAN, I. et al. Hippocampal neural cell loss in high-fat diet-induced obese rats—exploring the protein networks, ultrastructure, biochemical and bioinformatical markers. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 114, p. 101947, 1 jul. 2021.

ANWAR, H. et al. Gut Microbiome: A New Organ System in Body. **Parasitology and Microbiology Research**, 5 nov. 2019.

ARIQ NAZAR, M. et al. Effect of High-Fat Diet on SOD2, GPx, NeuN and BDNF Expression on Frontal Lobe of Obese Rats. **Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences**, v. 17, n. 4, p. 162–165, 2021.

ASADI, A. et al. Obesity and gut–microbiota–brain axis: A narrative review. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 36, n. 5, p. e24420, 1 maio 2022.

BAGANZ, N. L. et al. A requirement of serotonergic p38 $\alpha$  mitogen-activated protein kinase for peripheral immune system activation of CNS serotonin uptake and serotonin-linked behaviors. **Translational Psychiatry** 2015 **5:11**, v. 5, n. 11, p. e671–e671, 3 nov. 2015.

BILIMORIA, P. M.; STEVENS, B. Microglia function during brain development: New insights from animal models. **Brain research**, v. 1617, p. 7–17, 18 ago. 2015.

BONAZ, B.; BAZIN, T.; PELLISSIER, S. The vagus nerve at the interface of the microbiota-gut-brain axis. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, n. FEB, p. 49, 7 fev. 2018.

BOWEN, K. K.; DEMPSEY, R. J.; VEMUGANTI, R. Adult interleukin-6 knockout mice show compromised neurogenesis. **Neuroreport**, v. 22, n. 3, p. 126–130, 16 fev. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Na América Latina, o Brasil é o país com maior prevalência de depressão.** 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/setembro/na-america-latina-brasil-e-o-pais-com-maior-prevalencia-de-depressao>. Acesso em: 09 ago. 2022.

BROOKS, L. et al. Fermentable carbohydrate stimulates FFAR2-dependent colonic PYY cell expansion to increase satiety. **Molecular metabolism**, v. 6, n. 1, p. 48–60, 1 jan. 2016.

BULLÓ, M. et al. Systemic Inflammation, Adipose Tissue Tumor Necrosis Factor, and Leptin Expression. **Obesity Research**, v. 11, n. 4, p. 525–531, 1 abr. 2003.

BURGER-VAN PAASSEN, N. et al. The regulation of intestinal mucin MUC2 expression by short-chain fatty acids: implications for epithelial protection. **The Biochemical journal**, v. 420, n. 2, p. 211–219, 1 jun. 2009.

BUROKAS, A. et al. Targeting the Microbiota-Gut-Brain Axis: Prebiotics Have Anxiolytic and Antidepressant-like Effects and Reverse the Impact of Chronic Stress in Mice. **Biological Psychiatry**, v. 82, n. 7, p. 472–487, 1 out. 2017.

CANI, P. D. et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. **Gut**, v. 58, n. 8, p. 1091–1103, ago. 2009a.

CANI, P. D. et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. **Gut**, v. 58, n. 8, p. 1091–1103, ago. 2009b.

- CAPURON, L.; LASSELIN, J.; CASTANON, N. Role of Adiposity-Driven Inflammation in Depressive Morbidity. **Neuropsychopharmacology** 2017 **42:1**, v. 42, n. 1, p. 115–128, 11 jul. 2016.
- CARLESSI, A. S. et al. Gut microbiota–brain axis in depression: The role of neuroinflammation. **European Journal of Neuroscience**, v. 53, n. 1, p. 222–235, 1 jan. 2021a.
- CARLESSI, A. S. et al. Gut microbiota–brain axis in depression: The role of neuroinflammation. **European Journal of Neuroscience**, v. 53, n. 1, p. 222–235, 1 jan. 2021b.
- CASTANON, N.; LUHESHI, G.; LAYÉ, S. Role of neuroinflammation in the emotional and cognitive alterations displayed by animal models of obesity. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. JUL, p. 229, 2015.
- CHAVES FILHO, A. J. M. et al. IDO chronic immune activation and tryptophan metabolic pathway: A potential pathophysiological link between depression and obesity. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 80, p. 234–249, 3 jan. 2018.
- COLONNA, M.; BUTOVSKY, O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>, v. 35, p. 441–468, 26 abr. 2017.
- CRYAN, J. F. et al. The Microbiota-Gut-Brain Axis. **Physiological reviews**, v. 99, n. 4, p. 1877–2013, 2019.
- CUSSOTTO, S. et al. The Neuroendocrinology of the Microbiota-Gut-Brain Axis: A Behavioural Perspective. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 51, p. 80–101, 1 out. 2018.
- DOOLIN, K. et al. Diurnal Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Measures and Inflammatory Marker Correlates in Major Depressive Disorder. **International Journal of Molecular Sciences** 2017, **Vol. 18, Page 2226**, v. 18, n. 10, p. 2226, 24 out. 2017.
- DUNCAN, S. H. et al. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. **Environmental microbiology**, v. 11, n. 8, p. 2112–2122, ago. 2009.
- ERNY, D. et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. **Nature Neuroscience** 2015 **18:7**, v. 18, n. 7, p. 965–977, 1 jun. 2015.

- EVERARD, A. et al. Responses of Gut Microbiota and Glucose and Lipid Metabolism to Prebiotics in Genetic Obese and Diet-Induced Leptin-Resistant Mice. **Diabetes**, v. 60, n. 11, p. 2775–2786, 1 nov. 2011.
- FARDET, L.; FÈVE, B. Systemic glucocorticoid therapy: a review of its metabolic and cardiovascular adverse events. **Drugs**, v. 74, n. 15, p. 1731–1745, 10 set. 2014.
- FELGER, J. C. et al. Early activation of p38 mitogen activated protein kinase is associated with interferon-alpha-induced depression and fatigue. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 6, p. 1094–1098, 1 ago. 2011.
- FORSYTHE, P. et al. Mood and gut feelings. **Brain, behavior, and immunity**, v. 24, n. 1, p. 9–16, jan. 2010.
- FURUSAWA, Y. et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. **Nature** 2013 504:7480, v. 504, n. 7480, p. 446–450, 13 nov. 2013.
- GIBSON, G. R. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology** 2017 14:8, v. 14, n. 8, p. 491–502, 14 jun. 2017.
- GIRIDHARAN, V. V. et al. Maternal deprivation increases microglial activation and neuroinflammatory markers in the prefrontal cortex and hippocampus of infant rats. **Journal of psychiatric research**, v. 115, p. 13–20, 1 ago. 2019.
- GLUSHAKOV, A. O. et al. Chronic Upregulation of Cleaved-Caspase-3 Associated with Chronic Myelin Pathology and Microvascular Reorganization in the Thalamus after Traumatic Brain Injury in Rats. **International Journal of Molecular Sciences** 2018, Vol. 19, Page 3151, v. 19, n. 10, p. 3151, 13 out. 2018.
- GONZÁLEZ-MUNIESA, P. et al. Obesity. **Nature Reviews Disease Primers** 2017 3:1, v. 3, n. 1, p. 1–18, 15 jun. 2017.
- GULYAEVA, N. V. Functional Neurochemistry of the Ventral and Dorsal Hippocampus: Stress, Depression, Dementia and Remote Hippocampal Damage. **Neurochemical Research** 2018 44:6, v. 44, n. 6, p. 1306–1322, 24 out. 2018.

HASSAN, A. M. et al. High-fat diet induces depression-like behaviour in mice associated with changes in microbiome, neuropeptide Y, and brain metabolome. **Nutritional neuroscience**, v. 22, n. 12, p. 877–893, 2 dez. 2019.

HE, M. CHAO et al. Paricalcitol alleviates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior by suppressing hypothalamic microglia activation and neuroinflammation. **Biochemical pharmacology**, v. 163, p. 1–8, 1 maio 2019.

HEIMANN, E. et al. Branched short-chain fatty acids modulate glucose and lipid metabolism in primary adipocytes. <http://dx.doi.org/10.1080/21623945.2016.1252011>, v. 5, n. 4, p. 359–368, 1 out. 2016.

JEON, S. W.; KIM, Y. K. Neuroinflammation and cytokine abnormality in major depression: Cause or consequence in that illness? **World journal of psychiatry**, v. 6, n. 3, p. 283, 2016.

JIANG, H. et al. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 48, p. 186–194, 1 ago. 2015.

KENNEDY, P. J. et al. Irritable bowel syndrome: a microbiome-gut-brain axis disorder? **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 39, p. 14105–14125, 21 out. 2014.

KÉRI, S.; SZABÓ, C.; KELEMEN, O. Expression of Toll-Like Receptors in peripheral blood mononuclear cells and response to cognitive-behavioral therapy in major depressive disorder. **Brain, behavior, and immunity**, v. 40, p. 235–243, 2014.

KHAN, A. et al. Neuroprotective Effect of Quercetin Against the Detrimental Effects of LPS in the Adult Mouse Brain. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 1–16, 1 dez. 2018.

KHANNA, D. et al. Obesity: A Chronic Low-Grade Inflammation and Its Markers. **Cureus**, v. 14, n. 2, 28 fev. 2022.

KIM, D. S. et al. Central visfatin potentiates glucose-stimulated insulin secretion and  $\beta$ -cell mass without increasing serum visfatin levels in diabetic rats. **Cytokine**, v. 65, n. 2, p. 159–166, 1 fev. 2014.

KOLBE, I.; DUMBELL, R.; OSTER, H. Circadian Clocks and the Interaction between Stress Axis and Adipose Function. **International Journal of Endocrinology**, v. 2015, 2015.

KOWALSKI, G. M. et al. Resolution of glucose intolerance in long-term high-fat, high-sucrose fed mice Resolution of glucose intolerance in long-term high-fat, high-sucrose-fed mice. **Article in Journal of Endocrinology**, 2017.

KUNUGI, H. Gut Microbiota and Pathophysiology of Depressive Disorder. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 77, n. 2, p. 11–20, 1 out. 2021.

LI, Y. et al. High fat diet-induced obesity leads to depressive and anxiety-like behaviors in mice via AMPK/mTOR-mediated autophagy. **Experimental Neurology**, v. 348, p. 113949, 1 fev. 2022.

LIN, C. S. et al. Impact of the gut microbiota, prebiotics, and probiotics on human health and disease. **Biomedical journal**, v. 37, n. 5, p. 259–268, 1 set. 2014.

LIN, H. V. et al. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. **PloS one**, v. 7, n. 4, 10 abr. 2012.

LIU, J. J. et al. Peripheral cytokine levels and response to antidepressant treatment in depression: a systematic review and meta-analysis. **Molecular Psychiatry 2019 25:2**, v. 25, n. 2, p. 339–350, 19 ago. 2019.

LIU, R.; NIKOLAJCZYK, B. S. Tissue immune cells fuel obesity-associated inflammation in adipose tissue and beyond. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JULY, p. 1587, 2019.

LIZARBE, B. et al. High-fat diet consumption alters energy metabolism in the mouse hypothalamus. **International journal of obesity (2005)**, v. 43, n. 6, p. 1295–1304, 1 jun. 2019.

LUTZ, T. A.; WOODS, S. C. Overview of Animal Models of Obesity. **Current Protocols in Pharmacology**, v. 58, n. 1, p. 5.61.1-5.61.18, 1 set. 2012.

LYTE, M. Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: Microbial endocrinology in the design and use of probiotics. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 33, n. 8, p. 574–581, ago. 2011.

MAZZOLI, R.; PESSIONE, E. The neuro-endocrinological role of microbial glutamate and GABA signaling. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. NOV, p. 1934, 30 nov. 2016.

MCALLAN, L. et al. Disruption of brain-derived neurotrophic factor production from individual promoters generates distinct body composition phenotypes in mice. **American**

**Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 315, n. 6, p. E1168–E1184, 1 dez. 2018.

MCLAUGHLIN, T. et al. Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 1, p. 5–13, 3 jan. 2017.

MIKA, A. et al. Feeding the developing brain: Juvenile rats fed diet rich in prebiotics and bioactive milk fractions exhibit reduced anxiety-related behavior and modified gene expression in emotion circuits. **Neuroscience letters**, v. 677, p. 103–109, 11 jun. 2018.

MILANESCHI, Y. et al. Depression and obesity: evidence of shared biological mechanisms. **Molecular Psychiatry** 2018 **24:1**, v. 24, n. 1, p. 18–33, 16 fev. 2018.

MIRZAEI, R. et al. Role of microbiota-derived short-chain fatty acids in nervous system disorders. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 139, p. 111661, 1 jul. 2021.

MOHYUDDIN, S. G. et al. Effect of chitosan on blood profile, inflammatory cytokines by activating TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway in intestine of heat stressed mice. **Scientific Reports** 2021 **11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 18 out. 2021.

MYERS, M. G.; LEIBEL, R. L. Lessons From Rodent Models of Obesity. **Endotext**, 28 fev. 2015.

NASERIBAFROUEI, A. et al. Correlation between the human fecal microbiota and depression. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 26, n. 8, p. 1155–1162, 1 ago. 2014.

NEUFELD, K. M. et al. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. **Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v. 23, n. 3, mar. 2011.

OLSZANECKA-GLINIANOWICZ, M. et al. Clinical research Circulating visfatin level and visfatin/insulin ratio in obese women with metabolic syndrome. **Archives of Medical Science**, v. 8, n. 2, p. 214–218, 30 abr. 2012.

OXENKRUG, G. F. Genetic and Hormonal Regulation of Tryptophan–Kynurenine Metabolism. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1122, n. 1, p. 35–49, 1 dez. 2007.

OXENKRUG, G. F. Metabolic syndrome, age-associated neuroendocrine disorders, and dysregulation of tryptophan—kynurenine metabolism. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1199, n. 1, p. 1–14, 1 jun. 2010.

PANDEY, K. R.; NAIK, S. R.; VAKIL, B. V. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 7577, 1 dez. 2015.

PUTIGNANO, P. et al. Effect of small doses of dexamethasone on plasma leptin levels in normal and obese subjects: a dose-response study. **Journal of endocrinological investigation**, v. 26, n. 2, p. 111–116, 2003.

RESPONDEK, F. et al. Short-chain fructo-oligosaccharides modulate intestinal microbiota and metabolic parameters of humanized gnotobiotic diet induced obesity mice. **PloS one**, v. 8, n. 8, 12 ago. 2013.

RÉUS, G. Z. et al. Kynurenine pathway dysfunction in the pathophysiology and treatment of depression: Evidences from animal and human studies. **Journal of Psychiatric Research**, v. 68, p. 316–328, 1 set. 2015.

ROY SARKAR, S.; BANERJEE, S. Gut microbiota in neurodegenerative disorders. **Journal of neuroimmunology**, v. 328, p. 98–104, 15 mar. 2019.

SAVIGNAC, H. M. et al. Prebiotic feeding elevates central brain derived neurotrophic factor, N-methyl-D-aspartate receptor subunits and D-serine. **Neurochemistry international**, v. 63, n. 8, p. 756–764, 2013.

SAVIGNAC, H. M. et al. Prebiotic administration normalizes lipopolysaccharide (LPS)-induced anxiety and cortical 5-HT<sub>2A</sub> receptor and IL1- $\beta$  levels in male mice. **Brain, behavior, and immunity**, v. 52, p. 120–131, 1 fev. 2016.

SCHELLEKENS, H.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. Lean mean fat reducing “ghrelin” machine: hypothalamic ghrelin and ghrelin receptors as therapeutic targets in obesity. **Neuropharmacology**, v. 58, n. 1, p. 2–16, jan. 2010.

SCHMAAL, L. et al. Cortical abnormalities in adults and adolescents with major depression based on brain scans from 20 cohorts worldwide in the ENIGMA Major Depressive Disorder Working Group. **Molecular Psychiatry** 2016 22:6, v. 22, n. 6, p. 900–909, 3 maio 2016.

SEGUELLA, L. et al. High-fat diet impairs duodenal barrier function and elicits glia-dependent changes along the gut-brain axis that are required for anxiogenic and depressive-like behaviors. **Journal of Neuroinflammation**, v. 18, n. 1, p. 1–17, 1 dez. 2021.

SMITH, A. P.; SUTHERL, D.; HEWLETT, P. An Investigation of the Acute Effects of Oligofructose-Enriched Inulin on Subjective Wellbeing, Mood and Cognitive Performance. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 8887–8896, 28 out. 2015.

SONG, Q. et al. COX-2 inhibition rescues depression-like behaviors via suppressing glial activation, oxidative stress and neuronal apoptosis in rats. **Neuropharmacology**, v. 160, p. 107779, 1 dez. 2019.

SUN, M. et al. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. **Journal of gastroenterology**, v. 52, n. 1, 1 jan. 2017.

TCHERNOF, A.; DESPRÉS, J. P. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. **Physiological reviews**, v. 93, n. 1, p. 359–404, 1 jan. 2013.

USAMI, M. et al. Butyrate and trichostatin A attenuate nuclear factor kappaB activation and tumor necrosis factor alpha secretion and increase prostaglandin E2 secretion in human peripheral blood mononuclear cells. **Nutrition research (New York, N.Y.)**, v. 28, n. 5, p. 321–328, maio 2008.

VARZAKAS, T. et al. Innovative and fortified food: Probiotics, prebiotics, GMOs, and superfood. **Preparation and Processing of Religious and Cultural Foods**, p. 67–129, 1 jan. 2018.

WALLACE, C. J. K.; MILEV, R. The effects of probiotics on depressive symptoms in humans: A systematic review. **Annals of General Psychiatry**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 20 fev. 2017.

WANG, Z. BIN et al. The Potential Role of Probiotics in Controlling Overweight/Obesity and Associated Metabolic Parameters in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.

WANG, H. et al. Mannan-oligosaccharide modulates the obesity and gut microbiota in high-fat diet-fed mice. **Food & Function**, v. 9, n. 7, p. 3916–3929, 17 jul. 2018.

WESTER, V. L. et al. Long-term cortisol levels measured in scalp hair of obese patients. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 22, n. 9, p. 1956–1958, 2014.

WŁODARCZYK, M.; ŚLIŻEWSKA, K. Obesity as the 21st Century's major disease: The role of probiotics and prebiotics in prevention and treatment. **Food Bioscience**, v. 42, p. 101115, 1 ago. 2021.

WU, T. et al. Gut motility and enteroendocrine secretion. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 6, p. 928–934, 1 dez. 2013.

XIE, Z. et al. Potential Correlation Between Depression-like Behavior and the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in the Rat Hippocampus Following Spinal Cord Injury. **World Neurosurgery**, v. 154, p. e29–e38, 1 out. 2021.

YANG, X. D. et al. Effects of prebiotic galacto-oligosaccharide on postoperative cognitive dysfunction and neuroinflammation through targeting of the gut-brain axis. **BMC Anesthesiology**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 30 nov. 2018.

YAZDI, F. T.; CLEE, S. M.; MEYRE, D. Obesity genetics in mouse and human: back and forth, and back again. **PeerJ**, v. 3, n. 3, 2015.

YE, Y. C. et al. TNF $\alpha$ -induced necroptosis and autophagy via suppression of the p38-NF- $\kappa$ B survival pathway in L929 cells. **Journal of pharmacological sciences**, v. 117, n. 3, p. 160–169, 2011.

ZHANG, Y. et al. Fructooligosaccharides supplementation mitigated chronic stress-induced intestinal barrier impairment and neuroinflammation in mice. **Journal of Functional Foods**, v. 72, p. 104060, 1 set. 2020.

## ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS 135/2018 (IAM/FIOCRUZ)



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Aggeu Magalhães

### INSTITUTIONAL ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE (IACUC)

#### Letter of IACUC Approval

We certify that the project entitled “AÇÃO DOS PREBIÓTICOS (FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS E GALACTOOLIGOSSACARÍDEOS) E SUA ASSOCIAÇÃO COM A FLUOXETINA SOBRE AS VIAS DE SINALIZAÇÃO DA NEUROINFLAMAÇÃO, COGNIÇÃO E DEPRESSÃO EM MODELO ANIMAL DE OBESIDADE” (IACUC protocol number nº 135/2018), coordinated by **Christina Alves Peixoto** follows strictly the ethical principles in animal research and is in accordance with the Brazilian federal law 11.794/2008. The project was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the Aggeu Magalhães Institute/Oswaldo Cruz Foundation and is valid until february 2022. It is the responsibility of the Principal Investigator to notify the IACUC of any proposed changes regarding the work described within this project. The Principal Investigator agrees that no such changes will be implemented until approved by the IACUC/IAM.

Number of animals approved	
Species/Strain/Breed	Number of animals/Weight/Age/Sex
Inbred Mouse C57BL6 LDL r-/-	150 (20 gr/ 8-10 weeks / females)
<b>Total</b>	<b>150</b>

Recife (PE, Brazil), February, 06, 2019

**Fonte: CEUA/IAM – FIOCRUZ**