



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

GABRIELA FARIAS GUBERT

**Desenvolvimento de um modelo murino de desnutrição infantil e
caracterização da disbiose intestinal associada**

FLORIANÓPOLIS

2020

Gabriela Farias Gubert

**Desenvolvimento de um modelo murino de desnutrição infantil e
caracterização da disbiose intestinal associada**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rodrigo Zárate-Bladés

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Lani Volpe da Silveira

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Gubert, Gabriela

Desenvolvimento de um modelo murino de desnutrição infantil e caracterização da disbiose intestinal associada / Gabriela Gubert ; orientador, Carlos Rodrigo Zárate Bladés, coorientador, Eduardo Lani Volpe da Silveira, 2020.

124 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Desnutrição infantil. 3. Microbiota intestinal. 4. Restrição alimentar. 5. Modelo animal. I. Zárate-Bladés, Carlos Rodrigo . II. da Silveira, Eduardo Lani Volpe . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Gabriela Farias Gubert

**Desenvolvimento de um modelo murino de desnutrição infantil e
caracterização da disbiose intestinal associada**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Carlos Rodrigo Zárate-Bladés
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a. Fabienne Antunes Ferreira
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a. Yara Maria Franco Moreno
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Biociências.

Prof. Dr. Glauber Wagner
Coordenador do Programa

Prof. Dr. Carlos Rodrigo Zárate-Bladés
Orientador

Florianópolis, 19 de novembro de 2020

Este trabalho é dedicado à todas as mulheres que vieram antes de mim e lutaram pelo direito de se tornarem cientistas.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi desenvolvido a várias mãos, e para todas que fizeram parte desta história, eu agradeço. Entretanto alguns indivíduos foram completamente fundamentais e aqui os coloco em destaque.

Primeiramente, agradeço ao meu orientador Carlos Rodrigo Zárate-Bladés por tudo. O desenvolvimento desse trabalho foi bastante intenso, apresentou vários desafios no seu percurso e eu sempre pude contar com a sua orientação. O meu crescimento acadêmico nesses anos foi imenso. As trocas foram incontáveis.

Agradeço também aos meus colegas do iReg: Lucas Beltrame, Elisa Coltro, Isis Mello, Rafael Carvalho, Leonardo Gomes e Karolina Almeida pela troca e convivência. Mas em especial gostaria de agradecer a Livia Eslabão pelas horas divididas na bancada, e pelo seu infinito conhecimento de bioinformática que possibilitou esse trabalho.

Ao meu coorientador, Eduardo Lani Volpe da Silveira, pela oportunidade de coorientação.

À parceria com o Laboratório de Imunologia Aplicada dos professores Aguinaldo Pinto e em especial ao Prof Oscar Bruna-Romero que viabilizou o sequenciamento da microbiota e que foi fundamental para este trabalho. Ao laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada da professora Thaís Cristine Marques Sincero que nos auxiliou com técnicas moleculares e de sequenciamento. Como também, o Laboratório de Imunobiologia dos professores André Báfica e Daniel Mansur, o Laboratório de Protozoologia dos professores Edmundo Grisard, Patricia Stoco e Mario Steindel, o Laboratório de Bioinformática do professor Glauber Wagner, o Laboratório de Virologia Aplicada da professora Gislaine Fongaro e o Laboratório de Genética Molecular de Bactérias dos professores Fabienne Antunes Ferreira e Ricardo Ruiz Mazzon. Todos esses abriram suas portas para viabilizar experimentos, mas mais que isso, doaram seu tempo dividindo suas experiências para quem está iniciando sua formação acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, como também, o corpo docente, técnicos e meus colegas discentes. Em especial, gostaria de agradecer a coordenação dos professores Glauber Wagner e Rafael Rosa que buscaram ativamente estabelecer linhas de diálogos com os discentes. À Secretaria de Pós-Graduação, em especial ao Kleyton Steinbach, pela disponibilidade de ajuda

sem fim. À veterinária do departamento, Luciana Aparecida Honorato, e seu compromisso com o bem estar animal.

A UFSC por ter sido a minha casa durante toda minha formação acadêmica.

A CAPES pelo financiamento desse mestrado.

Meus colegas que me ensinaram tanto. Em destaque, os dois cientistas que dividem teto comigo e permitem que nos nossos almoços caibam conversas mirabolantes, Fabiola Eckert e Leonardo Gomes Kretzer.

E, por fim, mas não menos importante, aos meus pais, Silvio Luiz Gubert e Ivana Farias Gubert que me deram a segurança para tomar cada passo no caminho.

Seu Nome é Hoje

Somos culpados de muitos erros e muitas falhas, mas nosso pior crime é abandonar as crianças, desprezando a fonte de vida. Muitas das coisas que precisamos podem esperar. A criança não pode. É exatamente agora que os seus ossos estão se formando, seu sangue está sendo produzido e seus sentidos estão se desenvolvendo. Para ela não podemos responder "Amanhã". Seu nome é "Hoje".

Gabriela Mistral, 1948

RESUMO

Estima-se que 45% dos óbitos de indivíduos menores de cinco anos de idade se relacionem com a desnutrição. Quadros graves de desnutrição infantil tem como tratamento o uso profilático de Cotrimoxazol, um antimicrobiano de amplo espectro. Apesar do tratamento promover ganho de peso, pouco se sabe sobre o impacto a curto e longo prazo na microbiota intestinal. A microbiota exerce um importante papel na regulação do sistema imunológico. Dessa forma, quadros de disbiose podem acarretar no estabelecimento de doenças crônicas na vida adulta. Para melhor explorar esse fenômeno, desenvolvemos um modelo animal de desnutrição infantil em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas. Os animais, com 21 dias de vida, foram submetidos a uma restrição alimentar de 40%, em relação ao consumo normal, por um período de três semanas. Posteriormente o status nutricional foi recuperado com a normalização gradual do volume de ração pelo período de duas semanas. Conforme preconizado pela Organização Mundial da Saúde, os animais desnutridos foram tratados, simultaneamente ao protocolo de desnutrição, com Cotrimoxazol pelo período de duas semanas. Dessa forma, foram criados quatro grupos experimentais: 1. Controle; 2. Desnutrido; 3. Cotrimoxazol; 4. Desnutrido + Cotrimoxazol. A restrição alimentar induziu um tipo de desnutrição aguda e grave nos animais, cujo déficit de peso ficou entre 35 a 44% em relação aos controles. Com a reintrodução gradual da alimentação, este quadro foi revertido e o índice de massa corporal dos animais foi normalizado. A desnutrição também diminuiu o peso do baço ($p < 0.01$) e globulinas no soro ($p < 0.0001$). O uso de Cotrimoxazol não interferiu nos parâmetros morfométricos. A microbiota foi estudada em amostras de fezes coletadas em três tempos experimentais: 1. Anterior; 2. Posterior à desnutrição; e 3. Após a recuperação do status nutricional. Foi realizado o sequenciamento da região V3-V4 do gene *16S RNA*. Nos animais controle, foi observado um aumento significativo da diversidade microbiana entre o primeiro tempo experimental e o último ($p = 0.0078$). Apesar disso, o perfil clássico de composição dos filós, com maior representação de Firmicutes e Bacteroidetes, foi mantida durante todos os tempos experimentais. Por outro lado, o protocolo de desnutrição interferiu diretamente nessa proporção, diminuindo Firmicutes, expandindo a de Bacteroidetes. Esse efeito foi ainda maior nos animais tratados somente com Cotrimoxazol. Porém quando o fármaco foi aplicado em animais desnutridos a proporção dos filós aproximou-se do observado no controle. Também foram observadas diferenças entre a composição da microbiota de machos e fêmeas nestas condições. Mais especificamente, enquanto camundongos machos desnutridos ou tratados com Cotrimoxazol apresentaram redução de representantes da família Ruminococcaceae, fêmeas com o mesmo tratamento apresentaram aumento dessa família. A recuperação nutricional, que foi capaz de normalizar a morfometria, não normalizou a composição da microbiota. Machos recuperados da desnutrição tiveram a diminuição de diversos táxons, como do gênero *Lactobacillus* sp.. Entretanto, animais recuperados da desnutrição e tratados com antimicrobiano tiveram aumento significativo dos filós Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria em relação aos animais somente desnutridos. Mesmo promovendo o crescimento de diversos filós, a composição da microbiota não foi normalizada nos animais desnutridos e tratados com o fármaco, seu uso resultou num outro perfil de disbiose. Dessa forma, é necessário que intervenções para desnutrição infantil considerem a disbiose da microbiota intestinal.

Palavras-chave: Cotrimoxazol. Microbiota intestinal. Restrição alimentar.

ABSTRACT

It is estimated that 45% of deaths of individuals under five years of age are related to malnutrition. Severe cases of child malnutrition are treated with the prophylactic use of Cotrimoxazole, a broad-spectrum antimicrobial. Although the treatment promotes weight gain, little is known about the short- and long-term impact on the intestinal microbiota. The microbiota plays an important role in regulating the immune system. Thus, dysbiosis can lead to the establishment of chronic diseases in adulthood. To better explore this phenomenon, we developed an animal model of child malnutrition in male and female C57BL/6 mice. The animals, with 21 days of life, were submitted to a 40% food restriction, in relation to normal consumption, for a period of three weeks. Subsequently, the nutritional status was recovered with the gradual normalization of the volume of feed for a period of two weeks. As recommended by World Health Organization, malnourished animals were treated, simultaneously with the malnutrition protocol, with Cotrimoxazole for a period of two weeks. In this way, four experimental groups were created: 1. Control; 2. Malnourished; 3. Cotrimoxazole; 4. Malnourished + Cotrimoxazole. Food restriction induced a severe acute malnutrition, with weight deficit between 35 and 44% in relation to controls. With the gradual reintroduction of feeding, this situation was reversed and the animals' body mass index was normalized. Malnutrition also decreased the weight of the spleen ($p < 0.01$) and globulins in the serum ($p < 0.0001$). The use of Cotrimoxazole did not interfere with the morphometric parameters. The gut microbiota was analyzed by sequencing the V3-V4 region of the 16S RNA gene extracted from feces, in three experimental points: 1. Before malnutrition; 2. After malnutrition; 3. After the recovery of nutritional status. In the control group, a significant increase in microbial diversity was observed between the first and the last experimental points ($p = 0.0078$). Despite this, the classic phyla composition profile, with a greater representation of Firmicutes and Bacteroidetes, was maintained throughout the experimental points. On the other hand, the malnutrition protocol directly interfered in this proportion, reducing Firmicutes and expanding Bacteroidetes. This effect was even greater in animals treated with Cotrimoxazole alone. However, when the drug was applied to malnourished animals, the proportion of phyla was similar with the observed in the control group. Differences were also observed between the composition of the male and female microbiota in these conditions. More specifically, while male malnourished mice or treated with Cotrimoxazole showed a reduction in members of Ruminococcaceae family, females with the same treatment showed an increase in members of this family. Nutritional recovery, which was able to normalize morphometry, did not normalize the composition of the microbiota. Males recovered from malnutrition had a decrease in several taxa, such as the genus *Lactobacillus* sp. Even though it promoted the growth of several phyla, the composition of the microbiota was not normalized in malnourished animals treated with the drug, and therefore, it resulted in a different dysbiosis profile, suggesting the need for interventions for child malnutrition that take into account the dysbiosis of the intestinal microbiota.

Keywords: Cotrimoxazole. Gut Microbiota. Food Restriction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho experimental	39
Figura 2. Curva de peso e consumo normal de ração de camundongos C57BL/6 controle, machos e fêmeas	49
Figura 3. Curva de peso dos grupos experimentais CTRL, DES, CMX e DES + CMX, para machos e fêmeas	51
Figura 4. O protocolo de desnutrição reduz significativamente o IMC para machos e fêmeas	52
Figura 5. Ganho de peso diário para machos e fêmeas durante a desnutrição e recuperação alimentar	53
Figura 6. Parâmetros gerais de comprimento em machos	55
Figura 7. Parâmetros gerais de peso dos órgãos em machos	57
Figura 8. Parâmetros gerais de comprimento em fêmeas	60
Figura 9. Parâmetros gerais de peso de órgãos em fêmeas	61
Figura 10. Parâmetros bioquímicos do sangue de machos após desnutrição..	62
Figura 11. Leucograma de machos e fêmeas após o protocolo desnutrição e recuperação	65
Figura 12. Curva de rarefação do sequenciamento	66
Figura 13. A microbiota intestinal dos animais não está completamente madura no início do protocolo de desnutrição	68
Figura 14. Abundância relativa dos filos da microbiota intestinal dos animais controle nos três tempos experimentais.....	69
Figura 15. Grupos de bactérias da microbiota intestinal de animais controle expandidos em cada tempo experimental	70
Figura 16. O uso de Cotrimoxazol não atua na diversidade microbiana dos camundongos machos	72
Figura 17. A relação Firmicutes/Bacteroidetes é alterada pelo protocolo de desnutrição e tratamento com Cotrimoxazol em camundongos machos.....	73
Figura 18. O uso de Cotrimoxazol reduz um maior número de espécies da microbiota intestinal do que a desnutrição em camundongos machos	75
Figura 19. O tratamento com Cotrimoxazol em camundongos machos desnutridos mitiga os efeitos da redução de espécies na microbiota intestinal	76

Figura 20. A diversidade da microbiota intestinal é pouco alterada em fêmeas após protocolo de desnutrição e de uso de Cotrimoxazol.....	77
Figura 21. A relação Firmicutes/Bacteroidetes é alterada pelo protocolo de desnutrição e tratamento com Cotrimoxazol em camundongos fêmeas.....	78
Figura 22. A desnutrição e o uso de Cotrimoxazol aumentaram os grupos microbianos compondo a microbiota intestinal de fêmeas	79
Figura 23. O tratamento com Cotrimoxazol mitiga os efeitos da redução de espécies na microbiota intestinal causados pela desnutrição em fêmeas.....	80
Figura 24. A recuperação nutricional dos animais não garante a recuperação da composição da microbiota intestinal	82
Figura 25. A relação Bacteroidetes/Firmicutes continua alterada na microbiota intestinal dos animais desnutridos e/ou tratados com Cotrimoxazol mesmo após a recuperação nutricional	83
Figura 26. A disbiose causada pela desnutrição e pelo uso de Cotrimoxazol é mantida após o protocolo de recuperação	84
Figura 27. O uso do antimicrobiano no quadro de desnutrição resulta no aumento de diversos grupos de bactérias na microbiota intestinal	85
Figura 28. A microbiota intestinal não é normalizada após os animais desnutridos serem tratados com Cotrimoxazol	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Modelos murinos de desnutrição	24
Tabela 2. Níveis de garantia dos componentes da ração conforme fornecedor	41
Tabela 3. Iniciadores utilizados para PCR do sequenciamento por síntese	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
BS-MIP	Biotério Setorial do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CMX	Cotrimoxazol
cm	Centímetros
CTRL	Controle
DEA	Disfunção entérica ambiental
DEP	Desnutrição energético-proteica
DES	Desnutrido
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>“Deoxyribonucleic acid”</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, do inglês <i>“Food and Agriculture Organization of the United Nations”</i>
IgA	Imunoglobulina A
IL-1 α	Interleucina 1 alfa
IL-10	Interleucina 10
IP	Intraperitoneal
IMC	Índice de massa corporal
kcal	Quilocaloria
KEGG	Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto, do inglês <i>“Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”</i>
kg	Quilograma
LEfSe	Análise Discriminante Linear associada a tamanho de efeito, do inglês <i>“Linear discriminant analysis Effect Size”</i>
m	Metros
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1, do inglês <i>“Monocyte chemoattractant protein-1”</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde, também do inglês <i>“World Health Organization - WHO”</i>
ONU	Organização das Nações Unidas
OTU	Unidade taxonômica operacional, do inglês <i>“Operational taxonomic unit”</i>

pb	Pares de base
PCoA	Análise de coordenadas principais, do inglês " <i>Principal coordinates analysis</i> "
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês " <i>Polymerase chain reaction</i> "
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês " <i>Ribonucleic acid</i> "
RUTF	Alimento terapêutico pronto para o uso, do inglês " <i>ready-to-use therapeutic food</i> "
s	Segundos
Sem	Semana
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa, do inglês " <i>Tumor necrosis fator alfa</i> "
Tregs	Células T regulatórias
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância, do inglês " <i>United Nations Children's Fund</i> "

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	DESNUTRIÇÃO INFANTIL	15
1.2	MODELOS ANIMAIS DE DESNUTRIÇÃO	18
1.2.1	RESTRIÇÃO CALÓRICO PROTEICA.....	19
1.2.2	PROTEÍNA DEFICIENTE	20
1.2.3	DIETAS REGIONAIS	21
1.2.4	MICRONUTRIENTES.....	22
1.3	DISBIOSE, DESNUTRIÇÃO E O DESENVOLVIMENTO INFANTIL	26
1.4	MICROBIOTA E O SISTEMA IMUNOLÓGICO.....	28
1.5	IMPACTO DOS ANTIBIÓTICOS NA MICROBIOTA INTESTINAL E IMUNIDADE.....	31
1.6	ANTIBIÓTICO COMO COADJUVANTE NO TRATAMENTO DA DESNUTRIÇÃO.....	34
1.7	HIPÓTESE	38
1.8	OBJETIVOS	38
1.8.1	Objetivo Geral.....	38
1.8.2	Objetivos Específicos	38
2	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	39
2.1	DESENHO EXPERIMENTAL	39
2.2	DECLARAÇÃO ÉTICA	39
2.3	MODELO ANIMAL.....	40
2.4	PROTOCOLO DE DESNUTRIÇÃO	41
2.5	PROTOCOLO DE RECUPERAÇÃO ALIMENTAR.....	42
2.6	TRATAMENTO COM ANTIMICROBIANO.....	42
2.7	AVALIAÇÃO DE PESO E TAMANHO.....	43
2.8	ANÁLISE HEMATOLÓGICA.....	43
2.9	PARÂMETROS GERAIS DE ÓRGÃOS	43
2.10	EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DAS FEZES.....	43
2.11	SEQUENCIAMENTO POR SÍNTESE	45
2.12	ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DO SEQUENCIAMENTO POR SÍNTESE	46
2.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
3	RESULTADOS	49
4	DISCUSSÃO	88
5	CONCLUSÃO	102
	REFERÊNCIAS.....	103

1 INTRODUÇÃO

1.1 DESNUTRIÇÃO INFANTIL

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define desnutrição como o desequilíbrio deficitário entre a ingestão de nutrientes e a necessidade fisiológica do indivíduo (WHO, 2020b). Em 1977, a OMS delineou um protocolo de caracterização da desnutrição usando dados antropométricos de peso e altura em relação a idade do indivíduo (WATERLOW, 1977). Tinha-se por objetivo facilitar estudos de larga escala, mesmo em nações com recursos escassos, e, assim, uniformizar a coleta de dados, buscando comparações globais entre populações distintas. Para essas comparações globais, era necessário levar em consideração características fenotípicas regionais. Portanto, nesse protocolo foi aplicado o conceito estatístico de *escore-z* (ou *escore padrão*), que indica o grau de desvio em relação à uma curva padrão. Dessa forma, curvas de crescimento padrão foram criadas individualmente para cada população, e o *escore-z* (quanto o indivíduo desvia dessa curva) pôde ser comparado a nível global. Um baixo *escore-z* correlaciona-se positivamente com a mortalidade infantil nos países em desenvolvimento (KIELMANN; McCORD, 1978).

Este protocolo também auxiliou na definição dos tipos de desnutrição, podendo ser: aguda, crônica e energético-proteica. A desnutrição aguda é caracterizada por uma perda de massa magra pontual, não crônica, e normalmente se manifesta com o indivíduo apresentando peso insuficiente para sua altura (IBRAHIM et al., 2017). Essa última ainda pode ser dividida em duas categorias: marasmo e Kwashiorkor. Marasmo é a síndrome causada pela resposta fisiológica à inanição, onde há a depleção do tecido adiposo subcutâneo e perda de massa magra, sendo mais comum em indivíduos com menos de 5 anos pelo alto requerimento calórico do desenvolvimento dessa faixa etária (GROVER; EE, 2009). Ainda, esse tipo de desnutrição aguda caracteriza-se pelo valor de peso para altura inferior a 3 desvios padrão em relação à curva de referência (*escore-z* igual a 3) (IBRAHIM et al., 2017). Enquanto Kwashiorkor, a forma mais grave, é comum em crianças mais velhas e é reflexo de uma dieta deficitária em proteína, mas não necessariamente em calorias. Sua definição é independente dos dados antropométricos, mas acontece através do

aparecimento de sintomas clássicos: edemas, dermatites, abdômen distendido e hepatomegalia (GROVER; EE, 2009). A desnutrição crônica, causada pela dieta insuficiente de forma duradoura ou recorrente, é responsável por quadros de inflamação crônica com conseqüente desenvolvimento de doenças, também crônicas, na vida adulta (por exemplo: diabetes e hipertensão). O indivíduo acometido por essa forma de desnutrição na infância costuma apresentar altura insuficiente para sua idade (IBRAHIM et al., 2017).

Desnutrição energético-proteica (DEP) é um termo geral que abrange todo déficit proteico ou calórico (energético). Devido à sua ampla definição, manifestação clínica da DEP apresenta-se de forma muito diversa. Frequentemente ocorre em países subdesenvolvidos, onde a dieta dos indivíduos é pobre em proteínas e rica em cereais ou carboidratos simples (IBRAHIM et al., 2017). A DEP costuma ser acompanhada também pela deficiência de micronutrientes, como vitaminas ou minerais específicos necessários para as funções fisiológicas regulares. Portanto, sua ocorrência na infância, momento em que o indivíduo está se desenvolvendo, pode gerar sequelas graves. Sua manifestação clínica depende da sua duração e do micronutriente deficitário. Por exemplo, o zinco é um cofator para mais de 200 reações enzimáticas e, quando sua concentração é reduzida pela DEP, déficits no crescimento e na maturação sexual podem ocorrer (CUNNINGHAM-RUNDLES *et al.*, 2005). O sistema imunológico também costuma ser comprometido em diferentes tipos de desnutrição. A produção do hormônio timosina, que regula a maturação de células T, é dependente de zinco (KITAMURA *et al.*, 2006). Já a falta de vitamina A é a maior causa de cegueira em crianças (IBRAHIM et al., 2017). O ácido retinóico, primeiro metabólito da vitamina A, regula a expressão gênica de mucinas (GRAY *et al.*, 2001), de imunoglobulina A (RUDRARAJU *et al.*, 2014; SEO et al. 2013), diferenciação de células dendríticas e células T na lâmina própria (BEIJER *et al.*, 2014; ROSS, 2012). A vitamina C, por sua vez, parece influenciar os cenários inflamatórios. Camundongos testados em um modelo de inflamação estéril tiveram uma resposta exagerada e atraso na resolução dessa inflamação quando em hipovitaminose (MOHAMMED *et al.*, 2014). A administração da vitamina C atenuou os efeitos danosos sobre os pulmões, rins e fígado em modelo de sepse letal por LPS (FISHER *et al.*, 2011; FISHER *et al.*, 2012; MOHAMMED *et al.*, 2014).

A desnutrição é um problema global que atinge todas as faixas etárias. Estimativas da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) apontam que 815 milhões de pessoas não consomem a quantidade de calorias mínimas diárias (FAO, 2017); e mais de 2 bilhões de pessoas apresentam alguma deficiência de micronutrientes (IFPRI, 2016). Esses adultos vivendo sob cenário de insegurança alimentar, além de ter a sua qualidade de vida reduzida, também tem menor condição de exercer sua parentalidade, portanto, esse número impacta também na desnutrição infantil. Mais de quatro décadas após a publicação do protocolo de Waterlow (1977), é estimado que 205,3 milhões de pessoas com idade inferior a 5 anos estejam sobrevivendo à desnutrição infantil (WHO, 2020b); e que 207 milhões apresentam sequelas no seu crescimento (FAO, 2017; UNICEF 2017). Como consequência mais grave do quadro, estima-se que 45% dos óbitos de indivíduos menores de cinco anos relacionam-se diretamente com a desnutrição (IFPRI, 2016).

A erradicação desse problema faz parte da Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável, idealizada pela Organização das Nações Unidas (ONU, 2015) e acordada com diversos países. Porém, a desnutrição infantil mostrou-se uma condição muito complexa, não ligada somente à ingestão calórica, mas também a sistemas político-econômico, relações entre nações, segurança alimentar e ao machismo institucional (IFPRI, 2018). O último relatório sobre a Nutrição Mundial concluiu que, apesar das metas firmadas, pouco progresso tem sido feito para erradicação da desnutrição (IFPRI, 2018). A falta de transparência e levantamento de dados de muitos países agrava a situação e escancara o descaso para o combate do problema. Descaso esse que, além dos problemas humanitários, também é refletido economicamente. O relatório de 2016 apontou que África e Ásia perdem 11% do valor do seu PIB anualmente para a desnutrição. A prevenção do quadro devolveria 16 dólares para cada único dólar investido (IFPRI, 2016). Isso acontece porque a desnutrição aumenta custos relacionados à saúde, reduz produtividade, e diminui o crescimento econômico, podendo perpetuar um ciclo de pobreza e desenvolvimento de doenças nas comunidades afetadas (WHO, 2020b).

Na América do Sul, o Brasil que vinha apresentando bons índices em relação à desnutrição infantil até 2007, com diminuição do número de crianças afetadas, não

apresentou nenhum levantamento posterior (FAO, 2017; IFPRI, 2018 UNICEF, 2018). E mesmo a melhora observada até 2007 não ocorreu de forma uniforme entre as crianças brasileiras. Naquele período, a desnutrição crônica afetava 7% das crianças da população geral, sendo maior para meninos (8,1%) do que para meninas (5,8%), porém dentro da população indígena esse índice se elevava para 30% (PNDS, 2006; UNICEF, 2018). As políticas públicas não têm alcançado populações historicamente marginalizadas, e com isso, a erradicação da desnutrição infantil ainda é uma meta nacional. Em regiões pobres que apresentam saneamento básico precário ou inexistente, a desnutrição infantil é frequentemente associada com a Disfunção Entérica Ambiental (DEA), caracterizada pela inflamação crônica do intestino e permeabilidade do tecido (KEUSCH, 2014). A desnutrição também foi associada com disbiose e imaturidade da microbiota intestinal (SUBRAMANIAN et. al., 2014), aumento da susceptibilidade a doenças diarreicas (IBRAHIM et. al., 2017) e menor resposta a vacinas orais (GILMARTIN; PETRI, 2015). O que se relaciona, mais uma vez, ao aumento de custos com a saúde pública, redução de produtividade e diminuição do crescimento econômico.

Em 1981, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou suas diretrizes para a desnutrição infantil severa no ambiente hospitalar. Nesse documento, preconizava-se o uso de antimicrobiano como tratamento de primeira linha, mesmo na ausência de infecção aparente. Em 1999, as diretrizes foram atualizadas, mantendo-se a recomendação do tratamento com Cotrimoxazol (25 mg of sulfamethoxazole + 5 mg of trimethoprim/kg) para crianças em desnutrição severa, mesmo na ausência de infecção. Além disso, a administração do fármaco foi ampliada para fora do ambiente hospitalar (WHO, 1999; WHO 2005). Conjuntamente ao tratamento com o antimicrobiano, é prescrito a administração de alimento terapêutico pronto para o uso (do inglês, *ready-to-use therapeutic food* – RUTF) respeitando a tolerância de ingestão da criança, mas com objetivo de atingir o valor energético de 100 a 135 kcal/kg/diária (WHO, 2013).

1.2 MODELOS ANIMAIS DE DESNUTRIÇÃO

Os modelos animais de desnutrição foram criados para entender o fenômeno fisiológico em condições controladas. Existem duas estratégias predominantes nos

modelos (WOODWARD, 2016) (Tab. 1). A primeira consiste na restrição calórico proteica a partir de uma dieta completa, restringindo a quantidade do consumo de ração. Já a segunda é a alimentação *ad libitum* de uma dieta desbalanceada com a falta de algum componente essencial, mas completa em outros aspectos, como por exemplo as dietas hipoproteicas, mas isocalóricas ou as dietas deficientes em algum micronutriente. Por último, há os modelos de dietas regionais que replicam em modelo animais o consumo humano da região, de forma que acabam misturando deficiências de proteínas com outros micronutrientes. Porém, apesar da morfometria ter sido uniformemente utilizada na categorização da desnutrição humana, poucos modelos animais buscaram a padronização do status nutricional com a morfometria do animal (ANSTEAD *et al.*, 2001), tornando muito difícil a correlação dos resultados obtidos nos modelos com as alterações clínicas observadas em humanos (WOODWARD, 2016). Apesar das limitações, o estabelecimento de modelos animais foi necessário para explorar os efeitos da desnutrição em diferentes níveis, fatores não nutricionais associados, como infecções e o efeito de drogas nesses cenários (CORTÉS-BARBERENA *et al.* 2008).

1.2.1 RESTRIÇÃO CALÓRICO PROTEICA

Um modelo amplamente utilizado, a restrição calórico proteica consiste em limitar o consumo de ração diária do animal, fazendo com que o seu consumo total seja apenas parte do que o animal com ração *ad libitum* consome. O uso da restrição calórico proteica na literatura está bastante associado com estudos de longevidade. As primeiras observações de experimentos de restrição alimentar realizados em roedores demonstraram um aumento na longevidade dos animais (OSBORNE *et al.*, 1917; McCAY *et al.*, 1943). Desde então, diferentes protocolos foram criados para murinos e a observação do aumento na expectativa de vida dos animais apresentou grande variação (30 a 50%) conforme o protocolo adotado (WEINDRUCH e SOHAL, 1997; WANAGAT *et al.*, 1999; SONNTAG *et al.*, 2000; FONTANA *et al.*, 2010). Contudo, todos esses protocolos foram realizados em animais adultos.

Posteriormente, os protocolos de restrição alimentar foram criados especificamente como modelos de desnutrição. Para isso, foi aumentando o volume

de ração restrita, buscando explorar os impactos do status nutricional em órgãos e sistemas, como por exemplo, o imunológico (MITTAL; WOODWARD, 1985). A literatura apresenta modelos de restrição que variam de 15% a 50% em relação ao consumo *ad libitum* (SALAMEH *et al.*, 2019). A restrição calórica de 25% da ração total durante o período de 24 dias, em camundongos BALB/c com idade de 26 dias, foi associada com perda de peso e atrofia do timo (NÚÑEZ *et al.*, 2013). Entretanto, uma restrição calórica de 30% por 14 dias em camundongos C57BL/6J de seis semanas de idade diminuiu os níveis de marcadores inflamatórios (TNF- α) (PAN *et al.*, 2018). Animais adultos são menos sensíveis à restrição alimentar, e os modelos que observam efeitos deletérios no sistema imunológico são mais agressivos, como por exemplo, jejum por 48h (LORD *et al.*, 1998; TANAKA *et al.*, 2011). Por outro lado, poucos modelos aplicam a restrição calórica proteica em camundongos jovens, optando por modelos que restrinjam nutrientes específicos, sem restringir o acesso à alimentação (WOODWARD, 2016).

1.2.2 PROTEÍNA DEFICIENTE

O modelo de dieta deficiente em proteínas é amplamente utilizado não para restringir o consumo de ração do animal, mas sim limitar a disponibilidade de proteína, tornando a dieta hipoproteica e isocalórica. Porém, mesmo isocalórica, a dieta leva à desnutrição em murinos (BROWN *et al.*, 2015a; EYZAGUIRRE-VELÁSQUEZ *et al.*, 2017). Em uma versão mais radical, totalmente isenta de proteína, foi observado a redução na altura das vilosidades intestinais em ratos adultos, diminuindo a área de absorção após 14 dias de dieta (BELMONTE *et al.*, 2007). As diferentes respostas encontradas na literatura estão relacionadas aos diferentes desenhos experimentais utilizados pelos modelos, a idade em que o animal é submetido à desnutrição, por exemplo, se mostra um fato decisivo para as sequelas observadas. Um exemplo disso é a resposta inflamatória resultante da desnutrição. No modelo com a total ausência de proteínas proposto por Belmonte *et al.* (2007), em animais adultos, não foi observada nenhuma diferença nos níveis plasmáticos de proteína de fase aguda, α 1-glicoproteína ácida. Entretanto, quando camundongos jovens (21 dias de vida) recebem dieta hipoproteica (7% de proteína na composição da ração total) pelo período de três semanas, percebe-se o aumento

da quantidade do marcador pró-inflamatório, proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) nas fezes (BROWNA *et al.*, 2015). Uma dieta ainda mais hipoproteica (4%) em camundongos da mesma faixa etária, submetidos a um protocolo de 2 semanas, aumentou a presença de marcadores pró-inflamatórios, lipocalina-2 e mieloperoxidase nas fezes (DALVI *et al.*, 2018). A mesma restrição, por um período mais longo, 4 semanas, levou a expressão aumentada de mRNA de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , MCP-1 e IL1- α , no fígado (DALVI *et al.*, 2018). Ou seja, camundongos de 21 dias são mais sensíveis a dietas hipoproteicas em relação a camundongos adultos.

O modelo hipoproteico mais radical de desnutrição feita em camundongos pós-desmame, através de ração constituída por 0.7% de proteína e administração por 16 dias, aumentou o número de monócitos e macrófagos na medula óssea e no sangue dos animais, com modificações na expressão dessas células que sugerem um aumento de susceptibilidade à doenças infecciosas (CORWARE *et al.*, 2014). Já em animais *germ-free*, uma dieta hipoproteica tornou-os menores em relação ao controle. Interessantemente, a colonização do comensal *Lactobacillus plantarum* normalizou o peso e estatura dos animais, mesmo no regime hipoproteico (SCHWARZER *et al.*, 2016), sugerindo uma relação direta entre desnutrição e a microbiota intestinal.

1.2.3 DIETAS REGIONAIS

As dietas regionais são dietas que simulam dietas humanas endêmicas. Países em desenvolvimento costumam apresentar baixo consumo proteico e alto consumo de carboidratos simples, porém isso não ocorre de forma homogênea, então os modelos regionais simulam condições específicas para recriar o fenótipo específico da região nos modelos animais (SALAMEH *et al.*, 2019). Nos anos 90, um grupo pernambucano desenvolveu um modelo de dieta básica do nordeste brasileiro para murinos (TEODOSIO *et al.*, 1990). Com base em um levantamento no consumo familiar da região, e levando em conta menores custos e disponibilidade dos alimentos, foi formulada uma ração à base de feijão, farinha de mandioca, carne seca e batata doce nas proporções observadas no consumo humano. O modelo apresenta redução de proteína (total de 7% formulação), gordura (total de 8.2% na

formulação), vitaminas e minerais em relação à ração controle. Através da administração da dieta, o fenótipo de marasmo, que era observado nas crianças da região, foi reproduzido nos animais (TEODOSIO *et al.*, 1990). Camundongos com 10 dias de vida, ainda em amamentação, submetidos à dieta básica do Nordeste brasileiro, apresentaram aumentada permeabilidade no jejuno, relacionada com a expressão reduzida de uma proteína de zona de oclusão chamada Claudin-3 (UENO *et al.*, 2011).

Em países como a Gana, que a população carente apresenta uma dieta baseada no consumo de milho, o fenótipo de desnutrição Kwashiorkor é bastante presente, sendo associado a esse alto consumo de carboidrato com ausência de proteínas (WILLIAMS, 1933). A dieta regional que foi desenvolvida para recriar o fenótipo de Kwashiorkor em modelo animal é, portanto, hipercalórica e hipoproteica (total de 6.4% na formulação), com pouca gordura (total de 3.4% na formulação) e minerais. Foi utilizada em modelos com primatas, onde reproduziu o fenótipo após 41 semanas de tratamento (FOLLIS, 1957). Porém em camundongos a dieta sozinha não foi capaz de criar o fenótipo, sendo necessário também o transplante de microbiota intestinal proveniente de crianças acometidas por Kwashiorkor (SMITH, 2013). Mais uma vez, a microbiota se mostra como um fator relevante dentro de quadros de desnutrição.

1.2.4 MICRONUTRIENTES

Dietas hipoproteicas muitas vezes levam também à falta de micronutrientes, como zinco e selênio, cuja fonte majoritária são produtos de origem animal (CUNNINGHAM-RUNDLES; MCNEELEY; MOON, 2005; FILTEAU; WOODWARD, 1982). Esses micronutrientes são também capazes de atuar regulando o sistema imunológico. Em um modelo animal, o consumo aumentado de selênio, modulou a ativação e diferenciação de células T (HOFFMANN *et al.*, 2010). Modelos com restrição de zinco na dieta não observaram maior permeabilidade no intestino, ou maior concentração de endotoxinas no plasma (ZHONG *et al.*, 2013). Porém, quando animais com dieta deficitária em zinco passam por desafios imunológicos, eles apresentam alterações, como diminuição do tamanho das vilosidades frente ao desafio com *Escherichia coli* enteroaderente (BOLICK *et al.*, 2014), e colonização

prolongada por *Shigella flexneri*, a qual pode ser revertida após suplementação de zinco (MEDEIROS *et al.*, 2019).

Outra ausência de micronutriente comum na dieta hipoproteica é a da vitamina A, pois a sua integração nas rotas metabólicas depende de proteínas transportadoras, como a proteína transportadora de retinol, que é prejudicada por uma disponibilidade inadequada de aminoácidos no fígado (IBRAHIM, 2018). Assim como nos modelos de restrição de proteínas, os modelos de restrição de micronutrientes são capazes de regular a disponibilidade de vitamina A através da dieta, criando cenários hiper ou hipovitamínicos (PAVERT *et al.*, 2014). Em um desses modelos, camundongos fêmeas foram submetidos às duas dietas, hiper e hipovitamínica para vitamina A, durante o período pré-gestacional até o momento do nascimento dos filhotes. Esses últimos foram mantidos sob o mesmo regime dietético até a vida adulta (10 semanas de idade). Nessa condição, foi possível observar que as células linfóides inatas do tipo 3 eram controladas por sinalização dependente de vitamina A ainda no ambiente intrauterino. O consumo materno de vitamina A também modificou o tamanho dos órgãos linfóides secundários e a eficiência da resposta imune nos filhotes, mesmo quando adultos (PAVERT *et al.*, 2014).

A vitamina D, responsável pela homeostase de cálcio e o metabolismo ósseo, também impacta na defesa do organismo (IBRAHIM *et al.*, 2018). Sua influência no sistema imunológico é complexa, estando relacionada tanto em vias pró-inflamatórias, com função antimicrobiana, como também com supressão de resposta anti-inflamatória (LAGISHETTY *et al.*, 2011; SASSI *et al.*, 2018; WHITE, 2012). Em um modelo de malária cerebral em camundongos C57BL/6, a administração de Vitamina D reduziu a resposta inflamatória, levando a uma patologia mais branda e maior sobrevivência após o desafio parasitário. Observou-se, no baço, a redução da expressão de IFN- γ e TNF, e, o aumento, de expressão de IL-10, e das células T. Enquanto isso, no cérebro, houve a redução da expressão das citocinas CXCL9 e CXCL10, e, de moléculas de citoadesão (ICAM-1, VCAM-1 e CD36) levando a redução do acúmulo de células T patogênicas e, em última análise, melhorando a barreira hematoencefálica dos camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA (HE *et al.*, 2014). Ainda, camundongos *knockout* para o receptor de Vitamina

D apresentaram maior resistência à infecção por *Leishmania major*, patógeno intracelular causador da leishmaniose (WHITCOMB *et al.*, 2012).

Tabela 1. Modelos murinos de desnutrição

Modelo	Tipo de animais	Idade de início	Crescimento	Observações	Referência
Restrição Calórica (RC)					
15% RC por 16 sem.	Machos C57BL/6*	7 sem.	Perda de peso	Menor inflamação (diminuição de MCP-1 no fígado)	(PARK <i>et al.</i> , 2017)
25% RC por 30 dias	Machos e fêmeas BALB/c*	4 sem.	Perda de peso	Atrofia do timo	(NÚÑEZ <i>et al.</i> , 2013)
30% RC por 2 sem.	Machos C57BL/6	6 sem.	Perda de peso	Menor inflamação (diminuição de TNF- α)	(PAN <i>et al.</i> , 2018)
50% RC por 9 dias seguidos de 40% RC por 5 dias	Machos e fêmeas CBA/J*	3 sem.	N.A.	Alterações na acumulação de colesterol das células epiteliais do timo	(MITTAL; WOODWARD, 1985)
100% RC por 2 dias	Machos C57BL/6J*	8 sem.	Perda de peso	Alterações no desenvolvimento de linfócitos B mediadas por leptina	(TANAKA <i>et al.</i> , 2011)
Proteína Deficiente					
0% de proteína por 14 dias	Machos Sprague-Dawley**	Adultos (não específico)	Perda de peso	Redução da altura das vilosidades intestinais, translocação microbiana	(BELMONT E <i>et al.</i> , 2007)
0.7% de proteína	Fêmeas BALB/c	Adultos com 18 gramas	Perda de peso	Aumento no número de monócitos e	(CORWARE <i>et al.</i> , 2014)

					macrófagos na medula e sangue	
4% de proteína por 20 dias	Machos Sprague Dawley	8 sem.	Perda de peso		Permeabilidade intestinal aumentada, encurtamento das criptas do colon	(EYZAGUIR RE-VELÁSQUE Z <i>et al.</i> , 2017)
4% de proteína por 2 sem.	Machos C57BL/6	3 sem.	N.A.		Aumento de lipocalina-2 e mieloperoxidase nas fezes	(DALVI <i>et al.</i> , 2018)
4% de proteína por 4 sem.	Machos C57BL/6	3 sem.	N.A.		Aumento na expressão de TNF- α , MCP-1 e IL1- α no fígado	(DALVI <i>et al.</i> , 2018)
7% de proteína por 14 dias	Fêmeas C57BL/6	3 sem.	Perda de peso		Sem atrofia das vilosidades intestinais e aumento de MCP-1 nas fezes	(BROWN <i>et al.</i> , 2015)
8.6% de proteína por 35 dias	Machos BALB/c <i>germ free</i>	3 sem.	Comprometimento no ganho de peso e tamanho		Resistência ao hormônio do crescimento	(SCHWARZER, <i>et al.</i> , 2016)
Dietas Regionais						
Dieta básica do nordeste brasileiro, 7.8% de proteína por 365 dias	Machos e fêmeas Winstar**	Vida intrauterina	Comprometimento no ganho de peso e tamanho		Fenótipo de marasmo como identificados em crianças desnutridas	(TEODÓSIO <i>et al.</i> , 1990)
Dieta básica do nordeste brasileiro, 7.8% de proteína por 6 sem.	Machos e fêmeas C57BL/6	2 sem.	Comprometimento no ganho de peso e tamanho		Aumentada permeabilidade no jejuno	(UENO <i>et al.</i> , 2011)
Micronutrientes						

Pobre em Selênio (0.08 mg/kg) por 8 sem.	Machos C57BL/6J	3 – 4 sem.	N.A.	Influencia na proliferação e regulação das células CD4+ <i>in vitro</i>	(HOFFMAN N <i>et al.</i> , 2010)
Pobre em zinco com desafio imunológico por Escherichia coli-enteroaderente	Machos C57BL/6	4 sem.	Perda de peso	Diminuição do tamanho das vilosidades, menor infiltrado de leucócito no íleo frente a infecção	(BOLICK <i>et al.</i> , 2014)
Dieta sem vitamina A por 10 semanas	Fêmeas C57BL/6	Vida intrauterina	N.A.	Diferenciação das células linfóides inatas do tipo 3 relacionada ao consumo de vitamina A	(PAVERT <i>et al.</i> , 2016)

Tabela adaptada a partir da publicação de SALAMEH *et al* (2019). Dados não avaliados (N.A.). Semana (sem.). Camundongos (*). Ratos (**).

1.3 DISBIOSE, DESNUTRIÇÃO E O DESENVOLVIMENTO INFANTIL

O fenótipo de desnutrição grave Kwashiorkor, descrito pela primeira vez em 1933 (WILLIAMS, 1933), apresenta um quadro de edema generalizado, esteatose hepática, erupções cutâneas, ulcerações e anorexia. E como mencionado anteriormente, para ser reproduzido em camundongos foi necessário também o transplante da microbiota proveniente de crianças afetadas para camundongos não colonizados (*germ-free*) (SMITH, 2013). Esse trabalho lançou luz na ligação entre a severidade dos quadros de desnutrição e a disbiose. O termo disbiose, é comumente descrito como a alteração na composição da microbiota, que ocorre devido a fatores ambientais ligados ao hospedeiro, e perturba o ecossistema em um nível superior a capacidade de resistência ou resiliência desse à mudança (LEVY *et al.*, 2017).

Outras observações mostraram que a microbiota parece exercer um papel fundamental no desenvolvimento do indivíduo. Camundongos *germ-free* são

menores que a sua contrapartida colonizada, independente do status nutricional. Porém, há uma recuperação no seu crescimento quando são colonizados por uma única cepa de *Lactobacillus plantarum*, efeito observado em dieta completa e hipoproteica (SCHWARZER *et al.*, 2016). O inverso também ocorre, e o desenvolvimento da microbiota depende do desenvolvimento do hospedeiro. Em um estudo sobre a microbiota fecal de crianças de Bangladesh, caracterizada do nascimento até o final do seu segundo ano de vida, através do sequenciamento do gene *16S rRNA* extraído de amostras de fezes, foi observado a existência de um perfil de composição da microbiota para cada etapa do desenvolvimento do indivíduo (SUBRAMANIAN *et al.*, 2014). Esse cenário foi descrito como amadurecimento da microbiota bacteriana. Quando crianças em desnutrição aguda ou crônica foram avaliadas quanto à composição da sua microbiota, percebeu-se que os perfis eram semelhantes ao de crianças mais novas (SUBRAMANIAN *et al.*, 2014). Portanto, a composição da microbiota de crianças desnutridas foi definida como imatura. Também observaram que o nível de imaturidade se relacionava com a severidade da desnutrição, isto é, quanto mais imaturo era o perfil de composição da microbiota, mais grave era o quadro de desnutrição do infante. Essas crianças, quando tratadas com alimento terapêutico, RUTF, apresentaram uma melhora transiente e não integral no perfil de maturidade dessa microbiota, mostrando que a recuperação nutricional não é suficiente para recuperar a disbiose causada pela desnutrição (SUBRAMANIAN *et al.*, 2014)

Portanto, dentro da desnutrição a disbiose parece ser um fator a ser considerado. Camundongos *germ-free* com 5 semanas de vida foram colonizados com a microbiota intestinal de crianças do Malawi, e tratados com a dieta regional que comumente essas crianças recebem e que certamente as leva à desnutrição (BLANTON *et al.*, 2016). De fato, essa dieta não atende os requerimentos nutricionais de humanos ou mesmo de camundongos. Como resultado, o grupo de camundongos colonizado pela microbiota oriunda de crianças desnutridas ganhou menos peso e massa magra em relação ao grupo colonizado pela microbiota derivada de crianças saudáveis, ainda que os dois estivessem submetidos à mesma dieta deficiente. Quando os animais dos dois diferentes grupos passaram a coabitar, e, portanto, trocar microbiota a partir do comportamento coprófago, aqueles com

microbiota imatura ganharam mais massa magra e peso em relação aos animais que não passaram por coabitação. Isso indicou que a microbiota parece se desenvolver junto com as necessidades do hospedeiro ao longo do tempo. Além disso, uma microbiota imatura pode restringir o crescimento do indivíduo (BLANTON *et al.*, 2016). Portanto, o desenvolvimento de dietas específicas para o amadurecimento da microbiota poderia melhorar o quadro de desnutrição e os índices de biomarcadores e mediadores de crescimento para esses indivíduos (GEHRIG *et al.*, 2019). Visto que a maior parte das publicações é dirigida à desnutrição aguda e a fotografia pontual desse cenário, e não suas sequelas (KANE; DINH; WARD, 2014), um maior número de estudos que possa relacionar os efeitos crônicos da disbiose e sequelas no desenvolvimento é fundamental para a aquisição de maior conhecimento nessa área e por isso a necessidade de desenvolvimento de modelos animais para a desnutrição.

1.4 MICROBIOTA E O SISTEMA IMUNOLÓGICO

Assim como a microbiota se relaciona com o desenvolvimento e status nutricional do indivíduo, ela também se relaciona com o sistema imunológico através de uma via de mão dupla, onde os dois componentes atuam um sobre o outro. Se por um lado, a microbiota é tolerada e modulada pelo sistema imunológico, por outro, o sistema imunológico amadurece e se regula com a presença da microbiota, seja através de seus metabólitos, padrões moleculares associados a eles ou até pelo contato direto (BELKAID; HARRISON, 2017). Uma estratégia para garantir a homeostase entre os dois é a distância física entre o tecido epitelial e a microbiota, pois limita a possibilidade de translocação de microrganismos para o tecido. No intestino, isso ocorre através de alguns componentes, sendo os principais: o muco, os peptídeos antimicrobianos (ambos produzidos principalmente pelas células epiteliais) e a imunoglobulina A (IgA), produzidos pelos linfócitos B. O muco é responsável pela proteção mecânica e impede a translocação, possibilitando a ancoragem dos comensais (McGUCKIN *et al.*, 2011; SCHROEDER, 2019). Já os peptídeos antimicrobianos limitam e controlam as populações de microrganismos (HOOPER; MACPHERSON, 2010). Alguns desses peptídeos são expressos de forma constitutiva, enquanto outros precisam de sinalizações da própria microbiota

para sua expressão (HOOPER; MACPHERSON, 2010). A IgA, por sua vez, é essencial para a manutenção da homeostase da microbiota intestinal em mamíferos, definindo a tolerância e a exclusão de patógenos (MCLOUGHLIN *et al.*, 2016; MOOR *et al.*, 2017; BUNKER; BENDELAC, 2018; DONALDSON *et al.*, 2018). Ela controla a interação da microbiota com o seu hospedeiro ligando-se e recobrando esses comensais (WAAIJ *et al.*, 1996; BUNKER; BENDELAC, 2018), regulando a expressão de epítomos dos mesmos, de forma a diminuir sinais pró-inflamatórios, (PETERSON *et al.*, 2007) e prevenindo a adesão desses organismos no tecido epitelial (BOULLIER *et al.*, 2009; FERNANDEZ *et al.*, 2003). Entretanto, em contextos inflamatórios, como na doença inflamatória intestinal, incluindo a doença de Crohn, a ligação com a IgA é apresentada de forma disfuncional ocorrendo em organismos não comensais (PALM *et al.*, 2014; VILADOMIU *et al.*, 2017). Em uma coorte de crianças em estado de desnutrição crônica, foi observada a diminuição de comensais reconhecidos por IgA e um aumento do reconhecimento de patobiontes (KAU *et al.*, 2015).

Embora esses mecanismos garantam a distância física mantida em prol da homeostase, antígenos e produtos metabólicos de bactérias comensais são detectáveis em tecidos periféricos (BALMER *et al.*, 2014; CLARKE *et al.*, 2010). Um exemplo disso são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Mamíferos não dispõem de mecanismos para digerir fibras, enquanto bactérias comensais o fazem através da fermentação e o resultado do processo são os AGCC (CUMMINGS *et al.*, 1987). Eles são utilizados como fonte de energia pelos enterócitos, mas também, ligam-se aos receptores acoplados à proteína G na membrana de células epiteliais e hematopoiéticas, atuando como inibidores de histonas deacetilases, modulando a expressão gênica dessas células (MACIA *et al.*, 2015; MASLOWSKI *et al.*, 2009). O aumento de AGCC circulante, tanto por meio de dieta quanto por administração direta (propionato), leva ao aumento da geração de macrófagos e precursores de células dendríticas (TROMPETTE *et al.*, 2014). Também são observados efeitos reguladores na expressão de citocinas. O butirato, por exemplo, reduziu a expressão de TNF- α , MCP-1, IL-6 em cultura de macrófagos ligados a adipócitos (OHIRA *et al.*, 2013). Como também já foi descrito o efeito antiinflamatório no cólon de camundongos e humanos (ANDOH; TSUJIKAWA; FUJIYAMA, 2003). Além disso, a atuação da

microbiota sobre a hematopoese é observada há mais de 30 anos, quando camundongos tiveram bactérias gram-negativas depletadas da sua microbiota intestinal, através do uso de antibióticos, acarretando na diminuição de células progenitoras de granulócitos e macrófagos (GORIS *et al.*, 1986). A inibição das histonas deacetilases também foi observada em macrófagos da lâmina própria do intestino, regulando negativamente a expressão mediadores pró-inflamatórios (CHANG *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2014).

Porém, essa regulação mútua dos dois sistemas pode gerar sequelas quando há o comprometimento de um deles, principalmente durante a infância, período de amadurecimento do sistema imunológico. Disbioses antes dos dois anos estão relacionadas com efeitos de longo prazo, como o desenvolvimento de doenças inflamatórias (ARRIETA *et al.*, 2014). Crianças em desnutrição são mais susceptíveis à disbiose e quadros de inflamação intestinal (ROBERTSON, 2020). A desnutrição, quando muito grave, compromete a integridade da mucosa intestinal (PETERSON; ARTIS, 2014), aumentando a translocação de microrganismos nos tecidos e a presença de marcadores pró-inflamatórios (PRENDERGAST; KELLY, 2012). A deficiência de micronutrientes, como zinco, vitamina A e vitamina D, também ocasiona lesões no epitélio levando à inflamação do tecido (ASSA *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2012). Esse quadro em crianças com desnutrição crônica parece impactar diretamente em seu desenvolvimento, visto que o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 apresenta uma correlação inversa com marcadores pró-inflamatórios (PRENDERGAST *et al.*, 2014). Além do tecido epitelial presente no intestino, a pele de crianças com Kwashiorkor também tem sua integridade comprometida (GROVER; EE, 2009), o que aumenta ainda mais a exposição a patógenos e marcadores pró-inflamatórios. Infelizmente, poucos modelos animais exploram os efeitos dessa exposição para a fisiologia do indivíduo, porém é observado um efeito somático em que a desnutrição é potencializada pela inflamação do intestino e vice-versa (IBRAHIM *et al.*, 2017).

Um modelo utilizado para compreensão da relação da microbiota com o sistema imunológico é o dos animais *germ-free*. Camundongos *germ-free* apresentam menor secreção de IgA e peptídeos antimicrobianos, um estado imaturo do tecido linfático associado ao intestino e menor número de linfócitos intestinais

(HOOPER; LITTMAN; MACPHERSON, 2012). Em contrapartida, camundongos tratados com ácidos graxos de cadeia curta, produto comum do metabolismo fermentativo de bactérias comensais, apresentaram proliferação de células T regulatórias (Tregs) (ARPAIA *et al.*, 2013), em específico o butirato, produto comum da classe Clostridia (FURUSAWA *et al.*, 2013). Já as células Tregs atuam também no controle da homeostase em mucosas, regulando a diferenciação de células T, e podendo suprimir respostas inflamatórias (KAMADA; NÓÑEZ, 2013).

Essa interação entre a microbiota e o sistema imunológico abriu a possibilidade de terapias baseadas na modulação da microbiota. Crianças indianas com 2 a 5 anos de idade e afetadas por desnutrição crônica tiveram uma recuperação no seu crescimento após doses diárias, pelo período de seis meses, de 50 ml do probiótico contendo apenas uma cepa de bactéria, *Lactobacillus acidophilus*, (SARAN; GOPALAN; KRISHNA, 2002). Camundongos sob desnutrição energético-proteica tratados com probiótico também tiveram melhor resultado frente ao desafio imunológico de infecção por *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium* (GALDEANO *et al.*, 2011). Em outro trabalho, camundongos desnutridos e com infecção por rotavírus foram tratados com probiótico (*Lactobacillus reuteri*) e tiveram a diarreia, sintoma clássico dessa infecção, diminuído (PREIDIS *et al.*, 2012).

1.5 IMPACTO DOS ANTIBIÓTICOS NA MICROBIOTA INTESTINAL E IMUNIDADE

Essas mudanças normalmente estão associadas com diminuição de diversidade, perda de táxons, mudanças metabólicas na microbiota e maior susceptibilidade a colonização de patógenos (LANGE *et al.*, 2016). Esses efeitos podem persistir para além do uso da droga. O uso de curto prazo, especialmente em crianças com até 2 anos de idade, pode levar a alterações crônicas na composição e funcionalidade da microbiota (VANGAY *et al.*, 2015). Um estudo administrou Clindamicina em humanos adultos e saudáveis por uma semana, e reportou impactos na microbiota que persistiram de 6 meses até dois anos após o uso do fármaco (JERNBERG *et al.*, 2007). Uma única dose de Clindamicina em camundongos diminuiu a diversidade da microbiota dos animais por pelo menos 28 dias, e tornou os animais mais susceptíveis a infecção por *C. difficile* (BUFFIE *et al.*, 2011). Uma possível explicação para o longo efeito do uso de antimicrobiano na

microbiota são as relações ecológicas. Os diferentes táxons que compõe a microbiota se relacionam entre si, e muitas vezes a própria existência de um depende da existência de outro. Um exemplo disso, é um trabalho que usou Vancomicina, a qual tem como alvo bactérias Gram-positivas, e observou a eliminação do filo Gram-negativo Bacteroidetes no ceco de camundongos (UBEDA *et al.*, 2010).

As diferentes classes de antibióticos apresentam diferentes perfis de perturbação na microbiota. As fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina, resultam em redução das bacilos aeróbicos Gram-negativos sem a colonização compensatória de bactérias Gram-positivas ou outros organismos, como leveduras (BORZIO *et al.*, 2001; LEUR *et al.*, 1997). Em humanos adultos, a redução observada varia muito entre indivíduos e normalmente é restaurada após 4 semanas do fim do uso do antimicrobiano (DETHLEFSEN *et al.*, 2008). Já na classe dos antimicrobianos glicopeptídeos, como as vancomicinas, o tratamento oral reduz várias espécies de *Enterococcus*, *Bifidobacteria*, *Bacteroides* e Clostridia mas promove o crescimento de cepas menos sensíveis aos antimicrobianos de algumas espécies do gênero *Enterococcus*, da família Lactobacillaceae e Enterobacteriaceae (com espécies patogênicas em potencial) (EDLUND *et al.*, 1997; YIN *et al.*, 2015). Já a clindamicina, da classe das lincosamidas, causa perturbações na microbiota que são observadas a longo prazo, e aumenta a susceptibilidade ao desenvolvimento de enterocolitis associada a *C. difficile* (ALMEIDA *et al.*, 2015; LOFMARK *et al.*, 2006; NYBERG *et al.*, 2007). As cefalosporinas de terceira geração, como a ceftriaxona que é excretada nas fezes em altas concentrações, são capazes de depletar a família das Enterobacteriaceae, mas facilitam o crescimento dos gêneros *Enterococcus* e *Candida*, como também as infecções por *C. difficile* (LAWLEY *et al.*, 2009; UBEDA, PAMER, 2012). Na classe dos Nitroimidazólicos, o metronidazol apresenta grande eficácia contra anaeróbicos, mas apresenta pouca mudança nos táxons cultiváveis, e aumento do gênero *Lactobacillus* spp (SULLIVAN *et al.*, 2001; UBEDA, PAMER, 2012). Entretanto, metronidazol combinado com claritromicina, um macrólido para o tratamento de infecção por *Helicobacter pylori*, promove crescimento de *Enterococcus* spp., enquanto reduz *E. coli*, *Bifidobacteria* spp., Clostridia e *Bacteroides* spp. (ADAMSSON *et al.*, 1999). Nos beta-lactâmicos, a amoxicilina tem

efeito moderado em redução da microbiota cultivável, porém depleta *Lactobacillus* spp. e aumenta as cepas resistentes na família Enterobacteriaceae (JERNBERG *et al.*, 2007; UBEDA e PAMER, 2012). Na maioria das pessoas tratadas, as perturbações causadas pela amoxicilina se apresentam por 30 dias após o fim do tratamento, porém, alguns indivíduos apresentam alterações por até 2 meses (LA COCHETIERE *et al.*, 2005).

Camundongos tratados desde o nascimento até a 6 semana de vida, com colistina e vancomicina, cujos alvos são bactérias Gram-negativos e Gram-positivos, respectivamente, apresentaram redução de folículos linfóides isolados (BOUSKRA *et al.*, 2008). Esses fazem parte do sistema imunológico que está associado a mucosa, adaptados para captação de antígeno. A expressão gênica de células T também pode ser modificada com o uso de antimicrobianos. Em camundongos tratados com um coquetel de ampicilina, vancomicina, neomicina e metronidazol, as células T do tipo $\gamma\delta$ expressaram menor número de Reg3 γ , um tipo de lectina que tem como alvo organismos Gram-positivos (ISMAIL *et al.*, 2011). Um outro coquetel parecido, formado por ampicilina, gentamicina, metronidazol, neomicina e vancomicina, administrado por 10 dias em camundongos, reduziu a produção das citocinas IFN γ and IL-17 por linfócitos T CD4 do intestino delgado (A HILL *et al.*, 2009).

Os efeitos negativos do uso de antimicrobianos também são observados durante a infecção, como a do vírus Influenza. A microbiota induz a expressão de duas pro-citocinas, pro-IL-1 β e pro-IL-18, que contribuem na defesa para o vírus influenza (ICHINOHE *et al.*, 2011). Após 4 semanas de tratamento com coquetel de vancomicina, neomicina, metronidazol e ampicilina, a produção dessas pro-citocinas foi diminuída e a titulação viral no pulmão teve um aumento significativo (ICHINOHE *et al.*, 2011). Este efeito também é observado para bactérias patogênicas. Camundongos tratados com estreptomicina por apenas 2 dias foram desafiados com *Salmonella* serovar Typhimurium apresentaram uma correlação positiva entre o escore de patologia no tecido e a perturbação na microbiota, ou seja, após o uso do antimicrobiano os animais tornaram-se mais susceptíveis à infecção. Foi detectado também um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , MCP-1 e IL-6) (UBEDA; PAMER, 2012).

1.6 ANTIBIÓTICO COMO COADJUVANTE NO TRATAMENTO DA DESNUTRIÇÃO

Para atender demanda e maximizar os lucros, a indústria pecuária buscou mecanismos para maior ganho de massa dos animais em um menor tempo. No final da década de 40, estudos com subdoses de antimicrobianos mostraram a capacidade desses em aumentar a taxa de crescimento dos animais, reduzir a mortalidade e diminuir a incidência de infecções (MOORE *et al.*, 1946; HARNED *et al.*, 1948; KNOEBEL e BLACK, 1952; BLACK e BRATZLER, 1952; JUKES *et al.*, 1950 ; STOKSTAD e JUKES, 1950). Essas observações levaram ao amplo uso de antimicrobianos pela indústria. Em animais jovens, uma meta-análise revelou que as subdoses de antimicrobianos aumentaram as taxas de crescimento dos animais em até 16% (CROMWELL, 2002). Simultaneamente, esses efeitos (ganho de massa, redução da mortalidade e infecções) eram também interessantes para o tratamento da desnutrição infantil. A partir disso, buscou-se estudar os efeitos das subdoses de antimicrobianos aplicados à essa condição. Em Nairobi, no Quênia, crianças internadas com desnutrição severa, mas sem sinal de infecção ativa, foram tratadas com subdoses de aureomicina. O grupo tratado apresentou a volta de apetite mais rápida, com conseqüente ganho de peso e menor incidência de infecções durante o tratamento (MACDOUGALL, 1957). Esses dados, eventualmente, reforçariam a possibilidade de uso deste tratamento de pacientes com desnutrição em locais de maior circulação de doenças infecciosas.

Porém, os mecanismos de atuação dos antimicrobianos como promotores de crescimento não estão ainda totalmente elucidados. Contudo, considera-se que a microbiota bacteriana é um dos fatores principais, pois além de ser alvo direto dos antimicrobianos, animais *germ-free* tratados com subdoses de penicilina não mostraram crescimento (COATES *et al.*, 1963). Alguns autores sugerem que a utilização de subdoses de antibióticos poderia inibir infecções subclínicas, a colonização de patógenos e diminuir a inflamação causada pela disbiose decorrente da desnutrição, reduzindo, assim, a ocorrência de enteropatias (GASKINS; COLLIER; ANDERSON, 2002; JONES *et al.*, 2014). Apesar dos benefícios da microbiota intestinal, há também um custo energético na sua manutenção (DIBNER; RICHARDS, 2005). Logo, a diminuição em abundância de microrganismos acarretaria em uma economia calórica. Além disso, a profilaxia com antimicrobianos

para crianças desnutridas é interessante pois elas são mais susceptíveis e não apresentam sinais clínicos clássicos para de infecção para pneumonia, bacteremia e infecções urinárias (LAZZERINI; TICKELL, 2011; CHRISTIE, C. D.; HEIKENS, G. T.; McFARLANE, D. E, 1988).

As evidências de crescimento associado ao uso de antimicrobiano levaram a modificação de diretrizes para o tratamento da desnutrição infantil crônica e aguda pela OMS. Em 1981, foi publicado um guia preconizando como tratamento de primeira linha, em ambiente hospitalar, o uso de antimicrobiano mesmo na ausência de infecção aparente. Em 1999, as diretrizes foram atualizadas, mas manteve-se a recomendação do tratamento com Cotrimoxazol (25 mg of sulfametoxazol + 5 mg of trimetoprima/kg) para crianças em desnutrição crônica ou aguda, mesmo na ausência de infecção, e até mesmo fora do ambiente hospitalar (WHO, 1999; WHO 2005).

O sulfametoxazol e a trimetoprima atuam inibindo diferentes etapas da via da síntese do ácido fólico níveis da síntese do ácido fólico em microrganismos. O ácido fólico é um cofator vital para a síntese de bases nitrogenadas. Portanto, os antimicrobianos individualmente apresentam efeito bacteriostático de amplo espectro. Porém, quando administrados juntos na forma de Cotrimoxazol, seu efeito sinérgico na mesma via acaba tornando-o bactericida (MASTERS *et al.*, 2003). O Cotrimoxazol teve uma grande importância nos anos 1980 do século passado, durante a epidemia da AIDS, pela proteção a diversos patógenos oportunistas (RUSKIN; LARIVIERE, 1991). Atualmente, o uso deste fármaco em países em desenvolvimento ainda ocorre de maneira significativa, devido ao fato de apresentar amplo espectro de atuação em microrganismos, ser bastante tolerável aos pacientes, estar fora da patente e ter preços acessíveis (CHURCH *et al.*, 2015).

A resistência bacteriana aos medicamentos é uma preocupação no tratamento da desnutrição. De fato, vários países africanos, amplamente acometidos pela desnutrição infantil, apresentam altas taxas de resistência *in vitro* para ampicilina e Cotrimoxazol (BACHOU *et al.*, 2006a; BACHOU *et al.*, 2006b; BABIREKERE-IRISO *et al.*, 2006; NOORANI *et al.*, 2005; RABASA, 2002; BAHWERE *et al.*, 2001). Entretanto, a resistência observada *in vitro* não necessariamente é observada com efeito clínico. No Maláui, um estudo randomizado

e duplo-cego testou três linhas de tratamento (placebo, amoxicilina e uma cefalosporina de terceira geração chamada cefdinir) em crianças com desnutrição crônica (TREHAN *et al.*, 2013). A inclusão do cefdinir como um tratamento alternativo, pois muitos trabalhos apontam uma alta taxa de genes de resistência a antimicrobianos em países da África Subsaariana (ASHLEY *et al.*, 2011; MANDOMANO *et al.* 2010; OKEKE *et al.*, 2007; REDDY *et al.*, 2010; WOERTHER *et al.*, 2011). Não houve diferença estatística entre os antimicrobianos em relação ao ganho de peso, mas ambos antibióticos apresentaram ganho superior ao placebo (TREHAN *et al.*, 2013). Já o Cotrimoxazol foi utilizado de forma profilática em crianças desnutridas e portadoras de HIV, diminuindo quase pela metade a mortalidade e apresentando melhoras no ganho de peso e altura em relação ao placebo (CHINTU *et al.*, 2004; PRENDERGAST *et al.*, 2011). Por outro lado, um estudo multicêntrico, duplo-cego, randomizado e incluindo grupo placebo, realizado no Quênia, utilizando Cotrimoxazol, só observou redução da mortalidade em crianças HIV soro positivas com desnutrição aguda. O efeito não foi observado para as crianças soro negativas (BERKLEY *et al.*, 2016).

Porém, mesmo após a estabilização dos casos graves de desnutrição infantil, há uma alta taxa de mortalidade após a alta hospitalar, ou a finalização do tratamento com antimicrobianos e a RUTF. No Malawi, um estudo de acompanhamento posterior ao tratamento de desnutrição aguda em crianças observou uma coorte de 1024 indivíduos por um ano. Nesse período 17% das crianças morreram (KERAC *et al.*, 2014). Um estudo semelhante realizado em Bangladesh acompanhou crianças por 3 meses, obtendo uma mortalidade de 9% após a finalização do tratamento (CHISTI *et al.*, 2014). Portanto a recuperação do status nutricional, e o tratamento com antimicrobiano, não garantem a sobrevivência do indivíduo, é possível que a normalização da microbiota melhore as taxas de sobrevivência.

Dessa forma, uma das dificuldades imposta na recuperação dessas crianças é a disbiose consequente da desnutrição e muito provavelmente também pelo tratamento associado com antimicrobianos. Mesmo o uso de antimicrobiano por períodos curtos parece ter efeito de longo prazo sobre a composição da microbiota intestinal (LANGE *et al.*, 2016; ISAAC *et al.*, 2016). O que implicaria, entre outros, no

desenvolvimento do sistema imunológico desses indivíduos, possivelmente deixando-os mais susceptíveis a infecções, doenças inflamatórias, e ironicamente, a colonização por patógenos (JONES *et al.*, 2014). Portanto o presente trabalho justifica-se pela necessidade de adaptar um modelo animal de desnutrição infantil que possibilitaria explorar a interação entre a desnutrição, a microbiota intestinal e o sistema imunológico. Para esse fim, foi utilizado o protocolo de desnutrição de Mittal e Woodward (1985) para recriar em camundongos C57BL/6 o fenótipo de desnutrição infantil, e diferentemente do trabalho original, caracterizar as alterações fenotípicas na presença e ausência do tratamento preconizado pela OMS, e principalmente, o impacto dessas situações na microbiota intestinal dos animais.

1.7 HIPÓTESE

Um modelo murino de desnutrição infantil pode reproduzir os fenótipos morfométricos e alteração na microbiota intestinal encontrados em humanos, de forma que o modelo possa ser utilizado para dimensionar o impacto do tratamento com antimicrobianos na condição de desnutrição.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Objetivo Geral

Adaptar um modelo animal de desnutrição infantil em camundongos C57BL/6 e caracterizar os efeitos da desnutrição e da recuperação nutricional em relação às características morfométricas e da microbiota intestinal, como também frente ao tratamento preconizado pela Organização Mundial da Saúde com Cotrimoxazol.

1.8.2 Objetivos Específicos

1.7.2.1. Adaptar um protocolo experimental de desnutrição infantil, considerando as principais características clínicas e de tratamento em humanos, em camundongos C57BL/6.

1.7.2.2. Caracterizar mudanças fenotípicas nos animais utilizando o protocolo gerado.

1.7.2.3. Caracterizar as mudanças na composição da microbiota decorrentes da desnutrição e do tratamento coadjuvante com antimicrobianos.

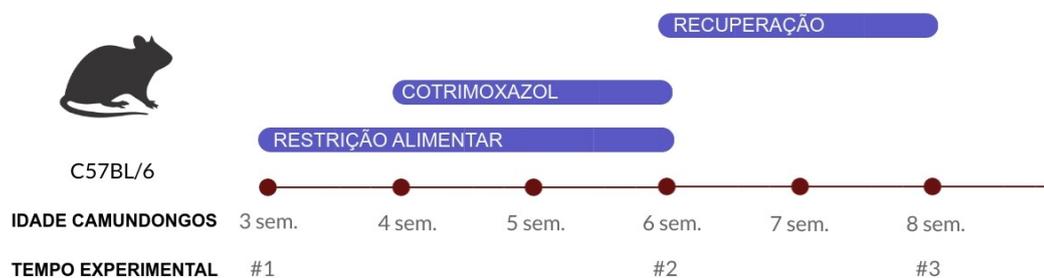
1.7.2.4. Caracterizar o grau de recuperação da disbiose após a normalização da nutrição considerando o uso ou não uso de tratamento coadjuvante aos antimicrobianos.

2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

2.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Para esse trabalho foram criados 4 grupos experimentais: 1) controle não tratado (CTRL); 2) submetido à desnutrição (DES); 3) tratado com Cotrimoxazol (CMX); 4) duplo tratado, submetidos tanto à desnutrição, quanto ao Cotrimoxazol (DES + CMX). As diferentes avaliações realizadas nesses grupos se deram em 3 tempos experimentais distintos: #1 – anterior a qualquer intervenção; #2 - após o término dos protocolos de desnutrição e Cotrimoxazol; #3 - após recuperação nutricional dos animais submetidos a desnutrição e/ou Cotrimoxazol (Fig. 1). O número de amostras não é uniforme entre os resultados, e por isso, está descrito em cada resultado.

Figura 1. Desenho experimental



Linha do tempo, relativa à idade do camundongo, expressa em semanas (sem.) identificando os tempos experimentais #1, #2 e #3, como também, a duração de cada protocolo.

2.2 DECLARAÇÃO ÉTICA

Todos os experimentos animais aqui apresentados foram realizados conforme o projeto aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob número de protocolo 5560250219.

2.3 MODELO ANIMAL

Como modelo animal foram selecionados camundongos C57BL/6 machos e fêmeas. Os protocolos experimentais foram iniciados após o desmame, ou seja, posterior a 18 dias de vida. Os animais foram provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina (BS-MIP), e foram alocados na experimentação do mesmo biotério até o momento de sua eutanásia. Foram mantidos sob temperatura controlada de 21 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12h, em gaiolas do tipo microisolador em estante ventilada. A seleção dos animais para composição dos grupos experimentais deu-se de forma aleatória, respeitando o limite de 5 animais por microisolador. Machos e fêmeas foram mantidos separados. Bebedouros, microisoladores e maravalha foram autoclavados antes do uso. A ração era balanceada (Tab. 2) e ionizada, específica para camundongos de laboratório, do tipo Puro Lab 22PB da marca Puro Trato Nutrição Animal. Para a eutanásia, os animais foram anestesiados (Ketamina 25 μ l + Xilazina 17 μ l via intraperitoneal – IP) e submetidos a deslocamento cervical. Os pontos finais humanitários foram definidos conforme preconiza o *National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research* – NC3Rs (RICHARDSON, 2014). Sendo eles: diminuição de temperatura corporal, diminuição maior que 10% da massa corporal diária, apresentação de tumor e demonstração de dor segundo a escala Grimace (LANGFORD *et al.*, 2010).

Tabela 2. Níveis de garantia dos componentes da ração conforme fornecedor

Cálcio (mín)	10 g/kg
Cálcio (máx)	12 g/kg
Extrato Etéreo (mín)	40 g/kg
Fósforo (mín)	8.000 mg/kg
Fibra Bruta (máx)	70 g/kg
Matéria Mineral (máx)	80 g/kg
Proteína Bruta (mín)	220 g/kg
Cobre (mín)	10 mg/kg
Iodo (mín)	2 mg/kg
Vitamina B12 (mín)	23 µg/kg
Vitamina B1 (mín)	5 mg/kg
Vitamina C (mín)	50 mg/kg
Ácido Fólico (mín)	1 mg/kg
Ferro (mín)	51 mg/kg
Sódio (mín)	2.700 mg/kg

2.4 PROTOCOLO DE DESNUTRIÇÃO

O modelo foi feito a partir do proposto por Mittal e Woodward (1985), o qual reduziu 40% da oferta de ração diária a partir do 21º dia de vida do animal. Para essa redução, é necessária a criação de uma curva de consumo normal. Portanto, nesse trabalho aqui apresentado, os animais com três semanas de idade foram pesados diariamente por 40 dias (Fig. 2). Durante esse período, além do peso individual aferido, também foi mensurado o volume de ração consumida. Afim de não criar um viés comportamental, os animais não foram individualizados durante os experimentos. Portanto, o consumo de ração foi calculado através de uma média de

consumo. Essa média foi calculada a partir da diferença no volume da ração presente nos microisoladores de um dia para o outro, e dividida pelo número de animais presentes no microisolador. Assim, foi estabelecida a média de consumo de ração diária dos animais. Essas médias foram utilizadas para calcular a redução da oferta de ração diária em 40%. Os valores estabelecidos, após a redução, foram de 1,7 g/dia/animal para machos, e 1,4 g/dia/animal para fêmeas.

2.5 PROTOCOLO DE RECUPERAÇÃO ALIMENTAR

Após as três semanas de desnutrição iniciou-se o período de recuperação, que durou duas semanas. Seu objetivo foi a restituição da disponibilidade de ração *ad libitum* de forma gradual, visto que anteriormente o nosso grupo não obteve uma boa resposta à recuperação quando a ração foi disponibilizada de uma só vez (Leticia F. Martendal, comunicação pessoal). Portanto, nessas duas semanas, houve um incremento de 0.5 g de ração na dose diária por animal no microisolador. Esse aumento é feito até o momento onde a dose de ração diária já é suficientemente grande de forma que ainda há ração disponível no dia seguinte, esse momento varia entre os grupos mas ocorre durante o período das duas semanas, onde é realizada a recuperação. Após esse período, o consumo de ração é totalmente normalizado, e a disponibilidade da mesma torna-se *ad libitum*.

2.6 TRATAMENTO COM ANTIMICROBIANO

Foi administrado 10 µL de Cotrimoxazol (25 mg de sulfametazol + 5mg de trimetropima/ml) por dia para cada animal, pelo período de duas semanas, conforme preconiza a OMS (1999) para os casos de desnutrição severa, mas sem infecção aparente. O Cotrimoxazol foi manipulado em uma farmácia veterinária com sabor de banana, com o propósito de maior palatabilidade aos animais. Para aplicação dele, utilizou-se um sistema formado por cânula e seringa. Após a contenção física dos animais, o conteúdo da seringa foi despejado em suas cavidade orais e foi observado o comportamento de deglutição para garantir a ingestão completa do fármaco. Para viabilizar o volume de aplicação, foi utilizado água ultrapurificada (MiliQ) junto com o antimicrobiano, totalizando um volume de 50 µl por aplicação.

2.7 AVALIAÇÃO DE PESO E TAMANHO

Os animais foram pesados diariamente em uma balança localizada no biotério, com auxílio de um copo Becker para contenção. O tamanho deles foi mensurado por meio de um paquímetro, em duas medições, uma para corpo outra para cauda. Em posição anatômica o corpo foi considerado da ponta do nariz ao começo da cauda. A cauda foi considerada toda porção final sem pelos aparentes. As medidas de tamanho só se deram nos tempos experimentais (#1, #2, #3), devido ao uso da anestesia para os procedimentos seguintes. Com essas, foi possível determinar o Índice de Massa Corporal (IMC) dos animais nos tempos experimentais. Para isso foi utilizada a equação onde o peso (kg) foi dividido pela altura (m) ao quadrado.

2.8 ANÁLISE HEMATOLÓGICA

Sob anestesia (Ketamina 25 µl + Xilazina 17 µl via intraperitoneal), foi coletado o sangue a partir de punção cardíaca utilizando seringa de 1 ml com agulha do tipo 26g 1/2. Com isso, foi preparado um esfregaço em lâmina histológica corada com Panótico Rápido, e posterior contagem diferencial dos leucócitos por microscopia. Também, a partir da coleta de sangue, foi feita a centrifugação do sangue total (na velocidade de 2000 x g durante 8 minutos) para análise de parâmetros bioquímicos no soro (colesterol, proteínas totais, albumina e globulina).

2.9 PARÂMETROS GERAIS DE ÓRGÃOS

Após eutanásia, foram isolados intestinos (grosso e delgado), baço, fígado, coração e rim. O comprimento dos dois intestinos e do baço foi medido com paquímetro. O fígado, coração, rim e baço foram pesados em balança de precisão.

2.10 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DAS FEZES

Para caracterizar a microbiota intestinal, foi utilizado a extração de DNA a partir das fezes dos animais. Todos os grupos foram submetidos a coleta de fezes nos 3 tempos experimentais. Para isso, os animais foram contidos e conforme defecavam suas fezes eram coletadas em microtubos de 2 ml autoclavados. As amostras foram mantidas em ultra freezer (-80°C) até o processamento (FOUHY *et al.*, 2015).

A extração do DNA foi realizada a partir do kit QiaAMP Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) conforme as orientações do fabricante, exceto que, no final do processo, as amostras foram eluídas em 50 μ L de H₂O miliQ. Brevemente, as amostras foram pesadas, diluídas de forma mecânica com auxílio de uma ponteira estéril em 1.4mL de solução para lise de fezes dentro do próprio microtubo e homogeneizadas por 1 min através de vortex. Foram mantidas em banho seco a 95 °C por 5 min, homogeneizadas e centrifugadas (por 1 min a 20.000 \times g). O volume 1.2 mL do sobrenadante foi transferido para novos microtubos e a isso, adicionou-se a pastilha *inhibitEX* para remover inibidores de PCR comumente presentes nas fezes. O conteúdo foi homogeneizado por 1 min com vortex e as amostras foram incubadas por 1 min a temperatura ambiente. Após centrifugação (de 3 min por 20.000 \times g), o sobrenadante total foi transferido para um novo microtubo, e novamente centrifugado nas mesmas condições. Em um novo microtubo, foi adicionado 15 μ L de proteínase K junto com o sobrenadante da centrifugação e a solução AL do *kit*. Após homogeneização por 15 segundos no vortex, a amostra foi incubada, em banho seco, a 70°C por 10 min. Para condensar o DNA, adicionou-se 200 μ L de etanol, seguido de homogeneização por 15 segundos. E tudo isso foi pipetado em uma coluna disponibilizada pelo kit e centrifugado (por 1 min a 20.000 \times g). A coluna foi transferida a um novo tubo coletor e, em seguida, foi adicionado 500 μ L da solução AW1, disponibilizada pelo kit, seguida de nova centrifugação sob as mesmas condições, e movendo a coluna para um novo tubo coletor. Nesse, foi adicionado 500 μ L da solução AW2, e novamente centrifugado (por 3 min a 20.000 \times g). Mais uma vez, a coluna foi transferida a um novo tubo coletor e, dessa vez, ela centrifugada sem adição de nenhuma solução. Por fim, o conteúdo da coluna foi eluído em 50 μ L de H₂O miliQ (incubado por 2 min a temperatura ambiente e centrifugado por 1 min a 20.000 \times g). A amostra resultante foi preservada em freezer a -20°C.

O DNA foi quantificado através de fluorometria (DOWNS; WILFINGER, 1983) com o Qubit™ (Thermo Fisher Scientific) utilizando o Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific). Para a quantificação, foi preparada uma solução de trabalho com o Qubit™ dsDNA BR Reagent diluído 1:200 em Qubit™ dsDNA BR Buffer. O volume final para análise de cada amostra e cada padrão,

preparado conforme instruções do fabricante, foi de 200 μ L, sendo 198 μ L de solução de trabalho e 2 μ L de amostra. As amostras foram homogeneizadas por vortex e incubadas por 2 min em temperatura ambiente. Logo em seguida foi realizada a leitura das curvas padrões e das amostras, estabelecendo a concentração de DNA contido em cada uma. A qualidade das amostras foi medida a partir de espectrofotômetro NanoVue™ Plus. Para isso 2 μ l da amostra homogeneizada foram pipetadas na placa leitora. Foram consideradas as relações de absorvância de 260/280, para identificar a pureza do DNA frente a contaminações de RNA, e valores próximos a 1.8 foram considerados ótimos, e 260/230 para identificar a pureza de DNA frente a contaminação por proteína, e os valores próximos a 2.0 foram considerados ótimos (BOGNER; KILLEEN, 2006). Para última confirmação da integridade da amostra foi realizado corridas de eletroforese em gel de agarose 1%, com marcador de 1 kb, coradas em brometo e visualizadas por meio de fotodocumentador. As amostras foram armazenadas em -20°C.

2.11 SEQUENCIAMENTO POR SÍNTESE

O sequenciamento por síntese foi realizado através da plataforma Illumina HiSeq2500 (Illumina Inc, Estados Unidos) amplificando a região V3-V4 do gene *rRNA 16S*. Os iniciadores utilizados foram 515F e 806R (Tab. 3) associados a seqüências *barcode* específicas para identificação de cada amostra, conforme descrito por Yu *et al.* (2005). A amplificação, por reação em cadeia da polimerase (PCR), foi realizada utilizando 15 μ l de Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs, Estados Unidos), 0,2 μ l de iniciadores *forward* e *reverse* e 10 ng de DNA template. As condições da amplificação foram 98°C por 1 minutos para desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 98°C por 10 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos, além de um passo de extensão final a 72°C por 5 minutos. O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2%, no qual o produto proveniente da PCR foi misturado em volumes iguais de *loading buffer* contendo *SYBR green*.

As amostras que apresentaram sua banda principal entre 400 e 450 pares de base foram selecionadas para o sequenciamento. Elas foram extraídas do gel utilizando o Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Alemanha), de acordo com as

instruções do fabricante. As bibliotecas foram geradas utilizando TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit (Illumina, Estados Unidos), conforme as instruções do fabricante, com adição dos adaptadores. A qualidade da biblioteca foi aferida por medições em fluorímetro Qubit™ 2.0 (Thermo Scientific, Estados Unidos) e pelo sistema 2100 Bionalyzer (Agilent Technologies, Inc, Estados Unidos). Por fim, as amostras foram sequenciadas na plataforma Illumina HiSeq2500 (Illumina Inc, Estados Unidos), resultando na geração de *paired-end reads* de 250 pb e efetuado na empresa GenOne (Rio de Janeiro, Brasil).

Tabela 3. Iniciadores utilizados para PCR do sequenciamento por síntese

Nome	Tamanho do fragmento	Sequência do Iniciador (5' - 3')
341F	292 pb	CCTAYGGGRBGCASCAG
806R	292 pb	GGACTACHVGGGTWTCTAAT

2.12 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DO SEQUENCIAMENTO POR SÍNTESE

Para as análises de metagenômica as sequências foram previamente ajustadas para remoção dos adaptadores pela empresa que realizou o sequenciamento. A análise de qualidade das sequências foi realizada utilizando FastQC, disponível pela própria Illumina no site <www.illumina.com/products/by-type/informatics-products/basespace-sequence-hub/apps/fastqc.html>. Sequências de baixa qualidade com tamanho inferior a 200 e com valor de *phred score* menor que 33 foram filtradas e retiradas da análise através da ferramenta Trimmomatic versão 0.36 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). O pareamento das sequências *paired-end* foi realizado pela metodologia de *denoising* com auxílio do DADA2, fornecido pelo QIIME 2 (BOLYEN *et al.*, 2019). Além do alinhamento das sequências, o DADA2 foi responsável pela identificação de quimeras, filtragem de singletons e geração de *amplicon sequence variant* (AVS). Após a etapa de *denoising*, foi realizada uma nova filtragem para remoção de AVS raras, utilizando um ponto de corte para variantes com frequência mínima de 2%. A identificação taxonômica foi realizada a partir da base de dados do SILVA versão 132 (QUAST *et al.*, 2012), utilizando classificadores disponibilizados pelo QIIME 2 para a região V3/V4 do gene

rRNA16S e a metodologia de classificação consenso do VSEARCH (ROGNES *et al.*, 2016).

2.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados morfométricos foram analisados, e tiveram suas figuras geradas, a partir do programa GraphPad Prism 5.0. A distribuição Gaussiana das amostras foi verificada a partir do teste de D'Agostino e Pearson. O conjunto de dados com distribuição não paramétrica foi analisado pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns. Enquanto o conjunto de dados com distribuição paramétrica, foi submetido a uma ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Tukey.

As análises estatísticas de sequenciamento foram realizadas com o software R versão 4.0.2 (R CORE TEAM, 2020). Para avaliação das alterações na microbiota intestinal em relação às abundâncias total e relativa, levando em consideração os diferentes grupos experimentais, foi utilizado o pacote phyloseq (MCMURDIE; HOLMES, 2013).

Para as análises de alpha-diversidade, foram calculados os índices de espécies observadas, o índice de riqueza Chao1 e os índices de diversidade Shannon e Simpson, através do pacote phyloseq (MCMURDIE; HOLMES, 2013). Após o cálculo dos índices, a análise de distribuição de frequências e o teste de Shapiro-Wilk foram aplicados para acessar a normalidade das amostras. Para amostras paramétricas foram aplicados os testes de Student (t) ou ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey, de acordo com as variáveis analisadas. Já para amostras não paramétricas, foram empregados os testes de Mann-Whitney-Wilcoxon ou gerado um modelo linear generalizado, seguido de ANOVA e Tukey.

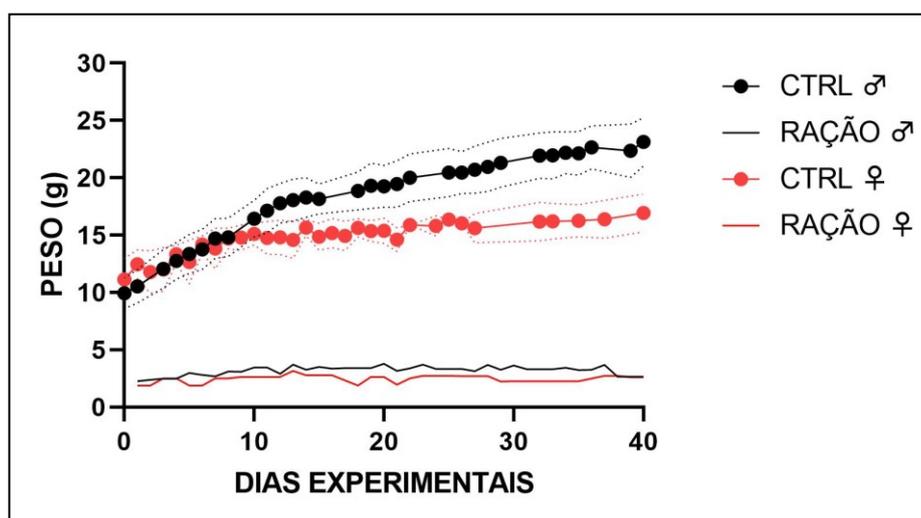
A beta-diversidade também foi acessada utilizando o pacote phyloseq (MCMURDIE; HOLMES, 2013) e o pacote vegan (OKSANEN *et al.*, 2019). Os dados de ordenação foram mensurados utilizando as metodologias de análise de coordenadas principais (PCA) e de escalonamento multidimensional não métrico (nMDS), ambas baseadas no índice de dissimilaridade de Bray-Curtis. Para determinar as diferenças estatísticas entre os grupos, foi realizado a análise de PERMANOVA (teste de adonis com 999 permutações) (ANDERSON, 2001).

Para acessar as diferenças na abundância de táxons da microbiota intestinal entre os grupos experimentais, foi utilizado o pacote DESeq2 c, que realiza a análise diferencial baseada em um modelo de distribuição binominal negativa. A correlação entre as diferenças de táxons e os grupos experimentais foi determinada pela metodologia de análise linear discriminante do tamanho do efeito (LEfSe) (SEGATA *et al.*, 2011). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

3 RESULTADOS

Primeiramente, animais controles sem qualquer intervenção foram acompanhados durante 40 dias e utilizados para determinar a curva de peso e consumo de ração para os dois sexos de camundongos da linhagem C57BL/6 (Fig. 2). Os dois sexos iniciaram o acompanhamento pesando cerca de 10 g, fêmeas com média de $11,15 \pm 1,84$ g, enquanto os machos iniciaram com $9,93 \pm 1,36$ g. Após 21 dias, fêmeas passaram a pesar $15,88 \pm 0,34$ g e machos $19,47 \pm 2,03$ g. No final do acompanhamento o peso final registrado para fêmeas foi de $16,93 \pm 1,67$ g machos $23,13 \pm 2,11$ g. Portanto, machos apresentam massa média maior que fêmeas da mesma faixa etária ($p= 0.0017$). Para estabelecer a dose diária a ser utilizada na desnutrição foi considerada a média do consumo de ração nos primeiros 14 dias experimentais. Para as fêmeas, o valor médio foi de 2,43 g, para os machos foi de 2,84 g. Como o protocolo de desnutrição determina uma redução em 40% do consumo de ração diário, os valores calculados foram de 1,46 g/dia/animal para fêmeas e 1,70 g/dia/animal para machos.

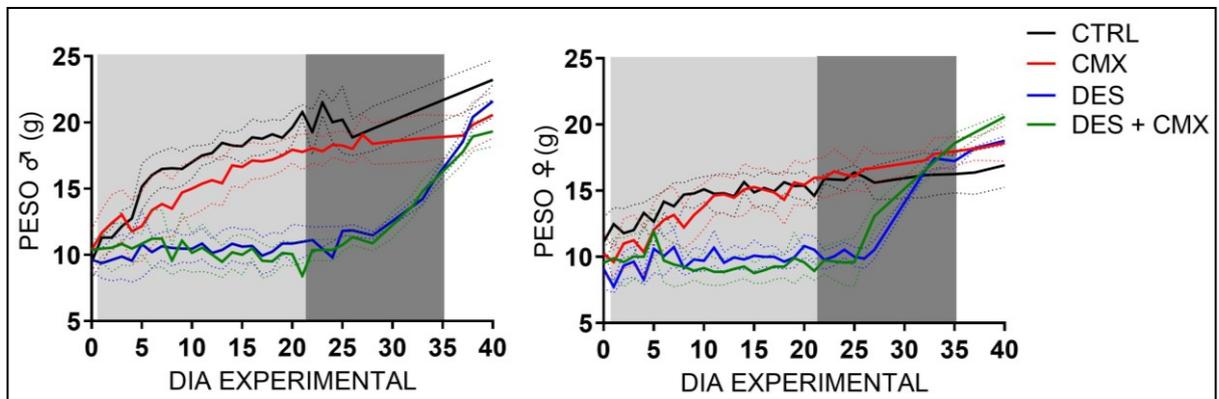
Figura 2. Curva de peso e consumo normal de ração de camundongos C57BL/6 controle, machos e fêmeas



A curva de crescimento é representada pela média \pm DP durante os dias experimentais (a partir da terceira semana de vida dos animais). O consumo de ração está representado como média de consumo diário por animal nas linhas contínuas da figura. Em preto, animais controle macho ($n=6$). Em vermelho, animais controle fêmea ($n=14$). Os pontos representam os dias em que os dados foram coletados. O acompanhamento de machos foi realizado em dois experimentos independentes, o de fêmeas em 4 experimentos independentes.

O mesmo acompanhamento de peso foi realizado para os grupos experimentais formados para esse trabalho: CTRL, CMX, DES e DES + CMX (Fig. 3). Os animais iniciaram o acompanhamento na terceira semana de vida e com peso próximo a 10 g. Os grupos submetidos a desnutrição, DES e DES + CMX mantiveram seu peso próximo de 10 g durante todo o protocolo de desnutrição. Ao final desse período (21º dia experimental), as fêmeas DES pesavam de $9,76 \pm 0,73$ g, e as DES + CMX $8,95 \pm 0,71$ g. Os machos DES pesavam $11,12 \pm 0,96$ g e os DES + CMX pesavam $10,36 \pm 0,78$ g. Em contrapartida, nesse mesmo período, os grupos com ração *ad libitum* ganharam peso. No dia 21º dia experimental o grupo macho CTRL pesava $19,27 \pm 1,70$ g e o macho CMX pesava $18,06 \pm 1,11$ g. As médias das fêmeas foram inferiores aos machos, porém superior aos animais com desnutrição. A média do grupo fêmea CTRL foi de $15,37 \pm 0,92$ g e CMX de $15,96 \pm 1,41$ g. O protocolo de recuperação, que acontece nos 14 dias posteriores a desnutrição, permitiu que os grupos se equiparassem. Após recuperação, os machos CTRL pesavam 19 g, CMX pesava 19,83 g, DES pesava 18,55 g e DES + CMX pesava 17,76 g. As fêmeas CTRL pesavam 16,25 g, CMX pesava 17,23 g, DES pesava 17,97 g e DES + CMX pesava 18,60 g.

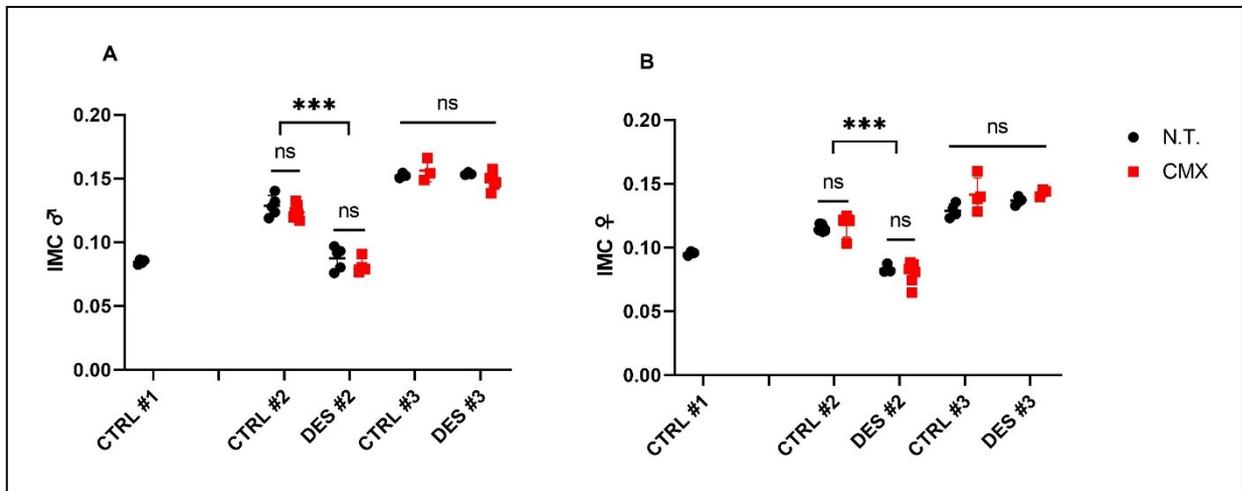
Figura 3. Curva de peso dos grupos experimentais CTRL, DES, CMX e DES + CMX, para machos e fêmeas



Medida de peso (g) representada por média (linha contínua) \pm DP (linha tracejada) por dia experimental. Área em cinza claro representa o protocolo de desnutrição. Área cinza escuro representa o protocolo de recuperação alimentar. Machos: Controle em preto (CTRL, $n=9$), Cotrimoxazol em vermelho (CMX, $n=10$), Desnutridos em azul (DES, $n=9$), Desnutrido + Cotrimoxazol em verde (DES + ANT, $n=7$). Fêmeas: Controle em preto (CTRL, $n=14$), Cotrimoxazol em vermelho (CMX, $n=11$), Desnutridos em azul (DES, $n=10$), Desnutrido + Cotrimoxazol em verde (DES + CMX, $n=7$).

Os animais também foram avaliados quanto ao índice de massa corporal (IMC) durante os diferentes tempos experimentais, #1 (início do protocolo), #2 (final da desnutrição), #3 (recuperação) (Fig. 4). Machos e fêmeas iniciam o protocolo experimental com IMCs próximos, sendo em média 0,096 e 0,085 respectivamente. Após a desnutrição (#2) os animais que sofrem desnutrição apresentaram índices menores ($p<0.0001$) em relação aos que não sofrem essa restrição. O tratamento com Cotrimoxazol não alterou o IMC quando comparado com animais submetidos ao mesmo regime nutricional. Após o protocolo de recuperação (#3) a diferença entre o IMC de todos os grupos experimentais não é significativa para os dois sexos.

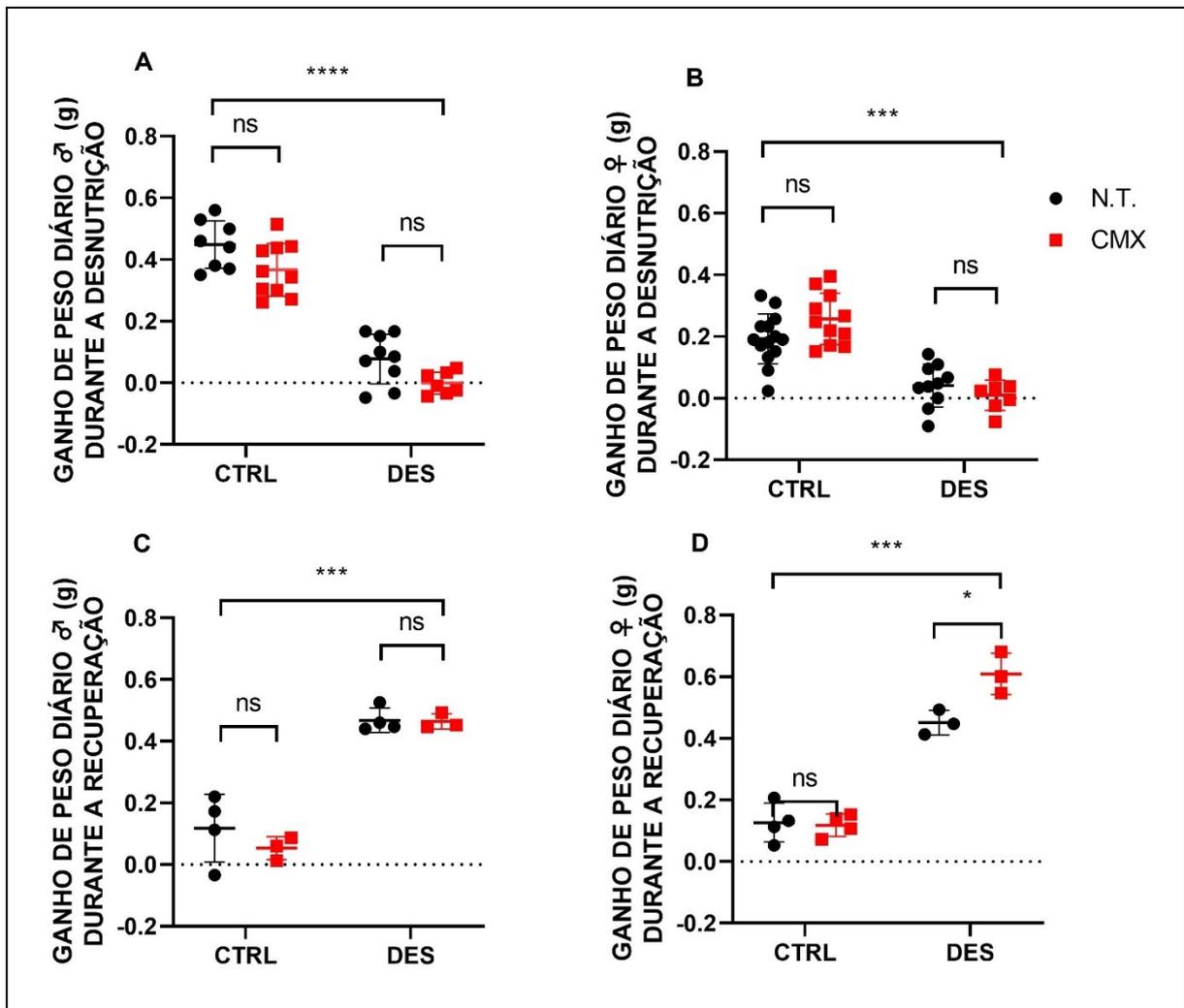
Figura 4. O protocolo de desnutrição reduz significativamente o IMC para machos e fêmeas



Média \pm DP do Índice de Massa Corporal apresentado pelos animais no início do protocolo (#1), ao final do protocolo de desnutrição (#2) e após a recuperação (#3). Em vermelho, os animais que tratados com Cotrimoxazol, em preto os animais não tratados (N.T.). **(A)** IMC dos machos experimentais. Tempo #1 (n=4), #2 (CTRL n=5, CMX n=7, DES n=5, DES+CMX n=4), #3 (CTRL n=3, CMX n=3, DES n=3, DES+CMX n=6). **(B)** IMC das fêmeas experimentais. Tempo #1 (n=3), #2 (CTRL n=7, CMX n=4, DES n=3, DES+CMX n=7), #3 (CTRL n=4, CMX n=4, DES n=3, DES+CMX n=3). Avaliou-se somente a diferença entre os grupos do mesmo tempo experimental. Diferença não significativa (ns), *** $p < 0.001$ Anova de duas vias, teste post hoc de Tukey.

A média de ganho de peso diário é maior nas primeiras três semanas experimentais (Fig 5.). Nesse período, onde acontece a desnutrição, os animais com ração *ad libitum* ganham 0,4 g/dia (machos) e 0,2 g/dia (fêmeas) (Fig. 5A e B). Nas duas semanas posteriores o ganho de peso diário decresce nos dois sexos (Fig. 5C e D). Para os animais que sofrem o protocolo de desnutrição, o momento de ganho de peso é invertido. Eles não conseguem ganhar peso durante a desnutrição, mas recuperam esse peso posteriormente. Em média, o valor de ganho de peso diário na recuperação é de 0,4 g para machos e 0,6 g para fêmeas. O Cotrimoxazol não apresentou diferença no ganho diário de massa dos animais, com exceção das fêmeas durante a recuperação, onde o grupo DES + CMX apresentou um ganho de peso diário superior em relação ao grupo DES ($p < 0.0197$).

Figura 5. Ganho de peso diário para machos e fêmeas durante a desnutrição e recuperação alimentar



Média \pm DP do ganho de peso diário, em gramas, dos animais em diferentes momentos experimentais. Em preto os grupos não tratados e em vermelho os grupos tratados com Cotrimoxazol. As medidas são apresentadas em centímetros. **(A)** Machos durante o período de desnutrição (CTRL n=8, CMX n=10, DES n=9 e DES + CMX n=7). **(B)** Fêmeas durante o período de desnutrição (CTRL n=14, CMX n=11, DES n=10 e DES + CMX n=7). **(C)** Machos durante o período de recuperação (CTRL n=4, CMX n=3, DES n=4 e DES + CMX n=4). **(D)** Fêmeas durante o período de recuperação (CTRL n=4, CMX n=4, DES n=3 e DES + CMX n=3). Diferença não significativa (ns), * $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ Anova de duas vias, teste post hoc de Tukey.

Além do acompanhamento do peso dos animais foram também avaliados parâmetros de comprimento para corpo, cauda, intestinos, baço e fêmur também foram analisados para machos (Fig. 6) e fêmeas (Fig. 8). O corpo dos machos inicia o experimento (#1) medindo $6,7 \pm 0,35$ cm. Após a desnutrição (#2) os grupos com ração *ad libitum*, CTRL e CMX, mediram respectivamente $8,09 \pm 0,37$ e $8,05 \pm 0,19$ cm. Em contrapartida os grupos restritos, DES e DES + CMX mediram $6,94 \pm 0,43$ e

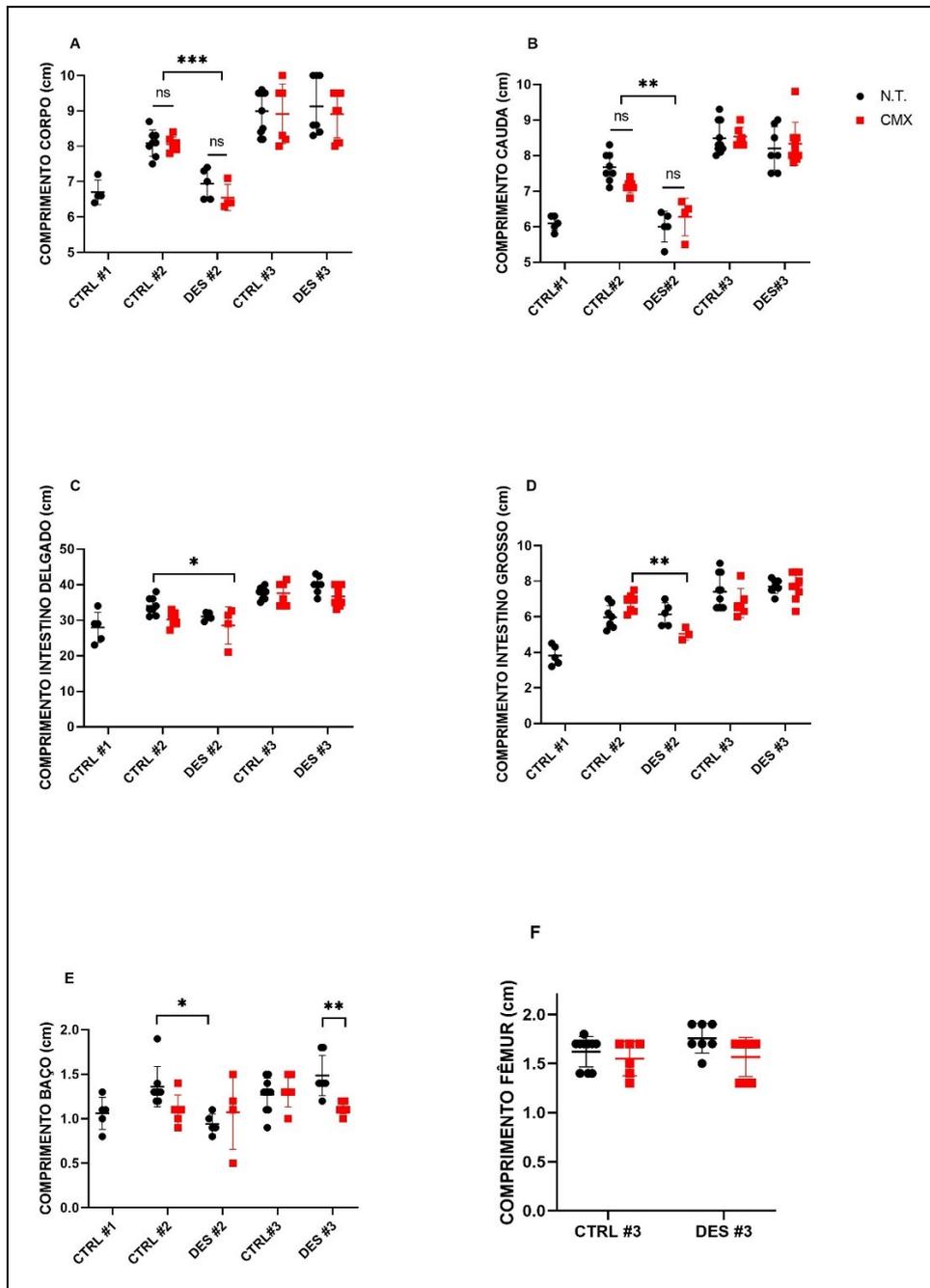
6,55 ± 0,37 cm. Após a recuperação (#3) o tamanho médio dos grupos se aproxima. Sendo para CTRL 9,0 ± 0,60, CMX 8,92 ± 0,85, DES 9,13 ± 0,82 e DES + CMX 8,91 ± 0,70 cm (Fig. 6A). O mesmo fenômeno é observado no tamanho da cauda dos animais (Fig. 6B). A cauda no tempo #1 mede 6,10 ± 0,21 cm. Após três semanas (#2) os grupos CTRL e CMX medem 7,68 ± 0,48 e 7,13 ± 0,18, respectivamente. Entretanto os grupos DES e DES + CMX apresentam médias menores, 6,00 ± 0,43 e 6,27 ± 0,53, respectivamente. Após o protocolo de recuperação (#3), não há mais diferença no comprimento da cauda entre os grupos experimentais, a média e desvio de cada grupo é de CTRL 8,49 ± 0,45, CMX 8,20 ± 0,62, DES 8,53 ± 0,27 e DES + CMX 8,33 ± 0,60 cm.

O comprimento do intestino delgado também apresenta o padrão de diferença após desnutrição (Fig. 6C). No tempo #1 o órgão mede 27,96 ± 4,28 cm. Após a desnutrição (#2) os grupos apresentam médias 34,04 ± 2,47 cm (CTRL), 30,17 ± 1,98 cm (CMX), 31,04 ± 1,07 cm (DES) e 28,50 ± 5,22 cm (DES + CMX). A menor média, do grupo DES + CMX, mostrou-se menor ($p < 0.01$) do que o CTRL. A recuperação (#3) volta a equalizar as diferenças, e o comprimento médio para os grupos é em média 37,70 ± 1,57 para CTRL, 37,57 ± 2,30 para CMX, 39,91 ± 2,40 para DES, 36,67 ± 2,65 para DES + CMX. O comprimento do intestino grosso (Fig. 6D) no tempo #1 foi de 3,82 ± 0,56 cm. Após o protocolo de desnutrição a média subiu para 5,98 ± 0,66 para o grupo CTRL, 6,72 ± 0,53 para o CMX, 6,14 ± 0,65 para DES e 4,85 ± 0,21 cm para DES + CMX, fazendo desse último o único a apresentar diferença estatística sendo significativamente menor em relação ao CMX ($p < 0.001$). Mais uma vez, após a recuperação (#3), os grupos não apresentaram diferença (CTRL 7,4 ± 1,00; CMX 6,77 ± 0,82; DES 7,71 ± 0,40; DES + CMX 7,73 ± 0,75 cm).

Em relação ao comprimento do baço os animais do tempo #1 apresentaram em média 1,06 ± 0,18 cm (Fig. 6E). Após a desnutrição (#2) os grupos mediram em média CTRL 1,36 ± 0,23, CMX 1,10 ± 0,17, DES 0,94 ± 0,11 e DES + CMX 1,07 ± 0,42 cm. Fazendo do grupo DES a menor média de todos, significativamente diferente do CTRL ($p < 0.01$). A recuperação (#3) apresenta médias de 1,27 ± 0,19 cm para CTRL, 1,32 ± 0,18 cm para CMX, 1,49 ± 0,23 cm para DES e 1,12 ± 0,07 cm para DES + CMX. Essas últimas se mostraram as mais diferentes, com DES + CMX sendo significativamente menor ($p < 0.001$). O comprimento do fêmur após a

recuperação (#3) foi uniforme, com a média de todos os grupos sendo $1,62 \pm 0,18$ cm.

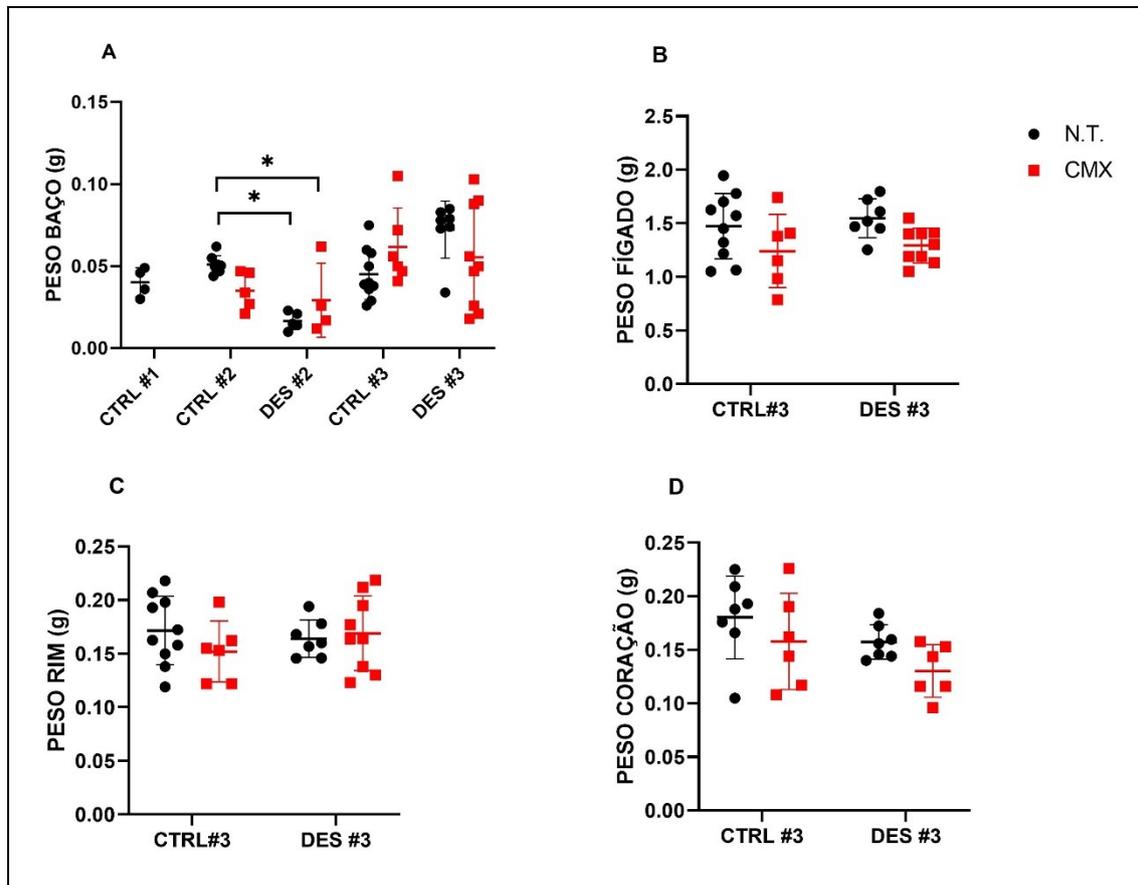
Figura 6. Parâmetros gerais de comprimento em machos



Média \pm DP dos parâmetros gerais de comprimento para machos dos grupos experimentais no início do protocolo (#1), ao final do protocolo de desnutrição (#2) e após a recuperação (#3). Em preto os grupos não tratados e em vermelho os grupos tratados com Cotrimoxazol. As medidas são apresentadas em centímetros de: (A) corpo; (B) cauda; (C) intestino delgado; (D) intestino grosso; (E) baço; (F) fêmur. Diferença não significativa (ns), * $p < 0.1$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Foi aplicado ANOVA de duas vias, teste post hoc de Tukey. Tempo #1, n=4. Tempo #2 (CTRL n=8, CMX= 7, DES n=5, DES + CMX n=4) Tempo #3 (CTRL n=10, CMX n=6, DES n=7, DES + CMX n=10).

Além do comprimento, parâmetros de peso dos órgãos dos animais machos também foram mensurados (Fig. 7). O baço inicia seu peso com uma média de $0,040 \pm 0,008$ g. Após a desnutrição (#2) o CTRL tem a maior média $0,051 \pm 0,005$ g, seguido do CMX com $0,035 \pm 0,015$ g, e as duas menores médias, com diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$), são DES e DES + CMX, respectivamente $0,017 \pm 0,005$ g e $0,029 \pm 0,023$ g. Após a recuperação (#3) não há diferença entre os grupos CTRL ($0,045 \pm 0,015$ g), CMX ($0,061 \pm 0,023$ g), DES ($0,072 \pm 0,017$ g) e DES + CMX ($0,055 \pm 0,032$ g) (Fig. 7A). O peso do fígado não apresentou diferença entre os grupos após recuperação, as médias foram $1,47 \pm 0,30$ g para CTRL, $1,24 \pm 0,34$ g para CMX, $1,55 \pm 0,18$ g para DES e $1,29 \pm 0,16$ g para DES + CMX (Fig. 7B). O rim também não apresentou diferença entre as médias após recuperação (CTRL pesando $0,17 \pm 0,03$ g, CMX pesando $0,15 \pm 0,03$ g, DES pesando $0,16 \pm 0,02$ g e DES + CMX pesando $0,17 \pm 0,03$ g) (Fig. 7C). Por fim, o coração, também não apresentou diferença entre os grupos CTRL ($0,18 \pm 0,04$ g), CMX ($0,16 \pm 0,04$ g), DES ($0,16 \pm 0,02$ g) e DES + CMX ($0,13 \pm 0,02$ g) (Fig. 7D).

Figura 7. Parâmetros gerais de peso dos órgãos em machos



Média \pm DP dos parâmetros gerais de peso dos órgãos dos grupos experimentais machos no início do protocolo (#1), ao final do protocolo de desnutrição (#2) e após a recuperação (#3). E preto os grupos não tratados e em vermelho os grupos tratados com Cotrimoxazol. Os valores são apresentados em gramas de: (A) baço; (B) fígado; (C) rim; (D) coração. * $p < 0.1$, ANOVA de duas vias, teste post hoc de Tukey. Tempo #1, $n = 4$. Tempo #2 (CTRL $n = 8$, CMX = 7, DES $n = 5$, DES + CMX $n = 4$) Tempo #3 (CTRL $n = 10$, CMX $n = 6$, DES $n = 7$, DES + CMX $n = 10$).

Da mesma forma que os machos, as fêmeas também foram acompanhadas quanto ao seu comprimento (Fig. 8). O comprimento do corpo no tempo #1 foi de $7,17 \pm 0,57$ cm. Após a desnutrição os grupos desnutridos, DES ($6,7 \pm 0,44$ cm) e DES + CMX ($6,37 \pm 0,52$ cm), ficaram menores ($p < 0.0001$) em relação aos grupos com ração *ad libitum*, CTRL ($7,75 \pm 0,24$ cm) e CMX ($7,76 \pm 0,38$ cm). Na recuperação as médias foram semelhantes para todos os grupos, CTRL ($9,07 \pm 0,30$ cm), CMX ($9,12 \pm 0,25$ cm), DES ($9,27 \pm 0,25$ cm) e DES + CMX ($9,33 \pm 0,29$ cm) (Fig. 7A). O comprimento da cauda inicia no valor de $5,97 \pm 0,21$ cm. E após a desnutrição os grupos CTRL ($7,51 \pm 0,34$ cm) e CMX ($7,37 \pm 0,33$) não apresentam diferença, nem os grupos com desnutridos DES ($6,66 \pm 0,70$ cm) e DES + CMX ($5,97 \pm 0,56$ cm) diferem entre si. Devido ao grande desvio padrão do grupo DES ele

também não apresenta diferença com CMX, porém DES é menor que o CTRL ($p < 0.001$). Por sua vez, o grupo DES + CMX é menor ($p < 0.0001$) em relação ao CTRL e, também, CMX. Após a recuperação os grupos apresentaram diferenças. O grupo CTRL ($8,27 \pm 0,25$ cm) foi menor ($p < 0.01$) em relação ao CMX ($8,82 \pm 0,27$ cm). O grupo DES + CMX ($7,97 \pm 0,25$ cm) foi o menor entre todos, e apresentou diferença com DES ($8,67 \pm 0,06$ cm) e CMX (Fig. 8B).

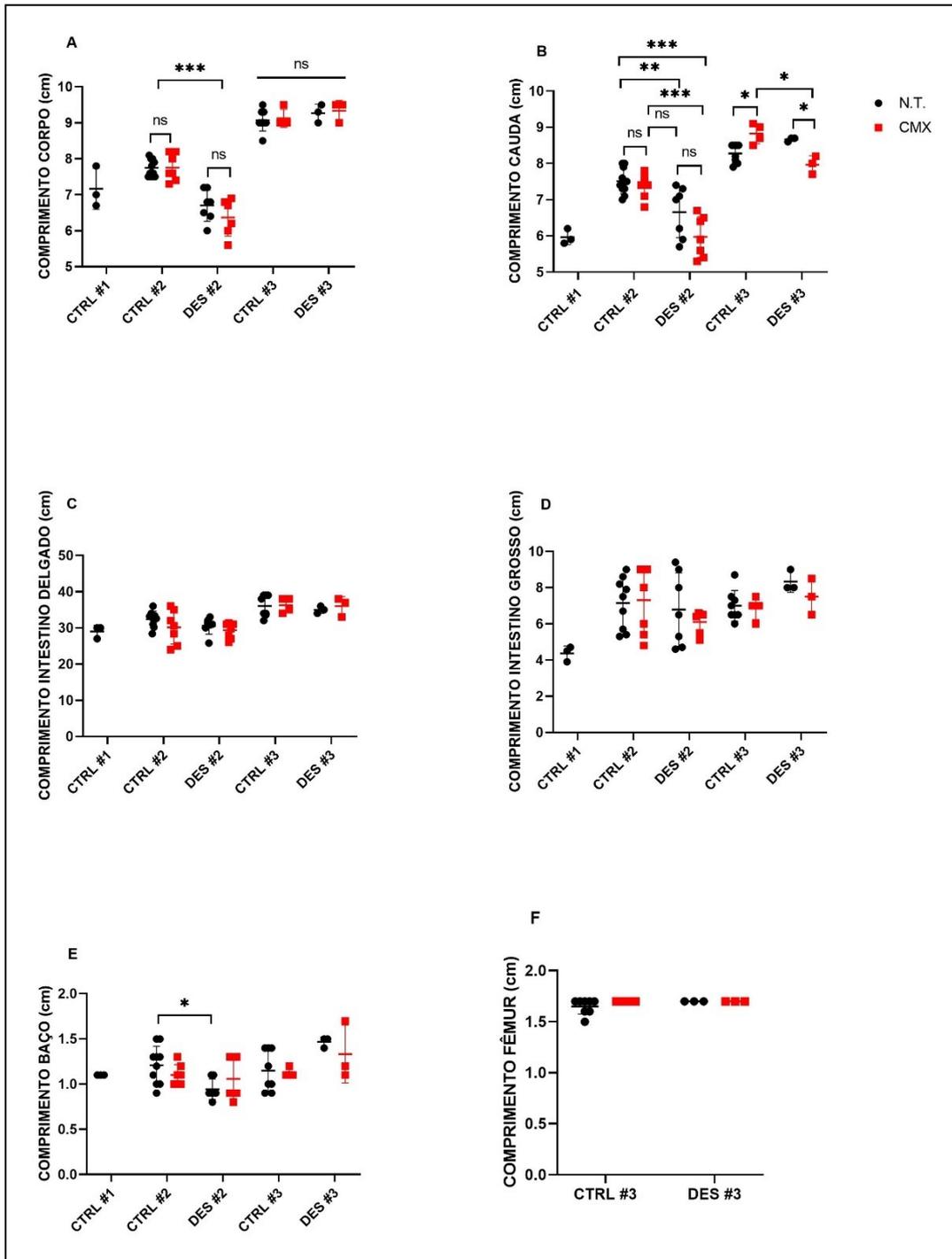
Quanto ao comprimento do intestino delgado as fêmeas do tempo #1 medem $29 \pm 1,73$ cm. Após a desnutrição os grupos CTRL ($32,38 \pm 2,24$ cm), CMX ($30,14 \pm 4,63$ cm), DES ($30,57 \pm 2,31$ cm) e DES + CMX ($29,40 \pm 2,11$ cm) não apresentaram diferença. Após a recuperação os grupos CTRL ($36,07 \pm 2,94$ cm), CMX ($36,25 \pm 2,06$ cm), DES ($35,00 \pm 1,00$ cm) e DES + CMX ($36,00 \pm 2,65$ cm) também não apresentaram diferença (Fig. 8C). O comprimento do intestino grosso iniciou com $4,37 \pm 0,42$ cm. No tempo #2 não houve diferença entre as médias dos grupos CTRL ($7,12 \pm 1,42$ cm), CMX ($7,31 \pm 1,86$ cm), DES ($6,79 \pm 2,03$ cm) e DES + CMX ($6,10 \pm 0,63$ cm). Tampouco a recuperação causou diferença entre os grupos CTRL ($7,00 \pm 0,84$ cm), CMX ($6,87 \pm 0,63$ cm), DES ($8,33 \pm 0,58$ cm) e DES + CMX ($7,50 \pm 1,00$ cm) (Fig. 8D).

O comprimento do baço no tempo #1 foi uniforme, $1,10 \pm 0,00$ cm. Após a desnutrição o grupo CTRL ($1,21 \pm 0,21$ cm) apresentou maior média, mas não apresentou diferença com CMX ($1,1 \pm 0,11$ cm) e com DES + CMX ($1,06 \pm 0,23$ cm), porém o grupo DES ($0,94 \pm 0,11$ cm) foi menor ($p < 0.01$). Após a recuperação, os grupos CTRL ($1,15 \pm 0,23$ cm), CMX ($1,12 \pm 0,05$ cm), DES ($1,47 \pm 0,06$ cm) e DES + CMX ($1,33 \pm 0,32$ cm) não apresentam diferença (Fig. 8E). O comprimento do fêmur, no tempo 33, foi bastante uniforme, e as médias de todos os grupos juntos foi de $1,68 \pm 0,05$ cm (Fig. 8F).

Os parâmetros de peso de alguns órgãos também foram estabelecidos para fêmeas (Fig. 9). O peso inicial do baço foi de $0,039 \pm 0,007$ g. Após a desnutrição, o grupo CTRL ($0,048 \pm 0,025$ g) foi o que apresentou a maior massa, apesar disso não há diferença para CMX ($0,033 \pm 0,009$ g), já os grupos DES ($0,014 \pm 0,002$ g) e DES + CMX ($0,019 \pm 0,013$ g) foram menores ($p < 0.001$) em relação ao CTRL. Após a recuperação, o grupo CTRL ($0,040 \pm 0,030$ g) apresentou o maior desvio padrão entre os tratamentos, e sua média não foi significativamente diferente de

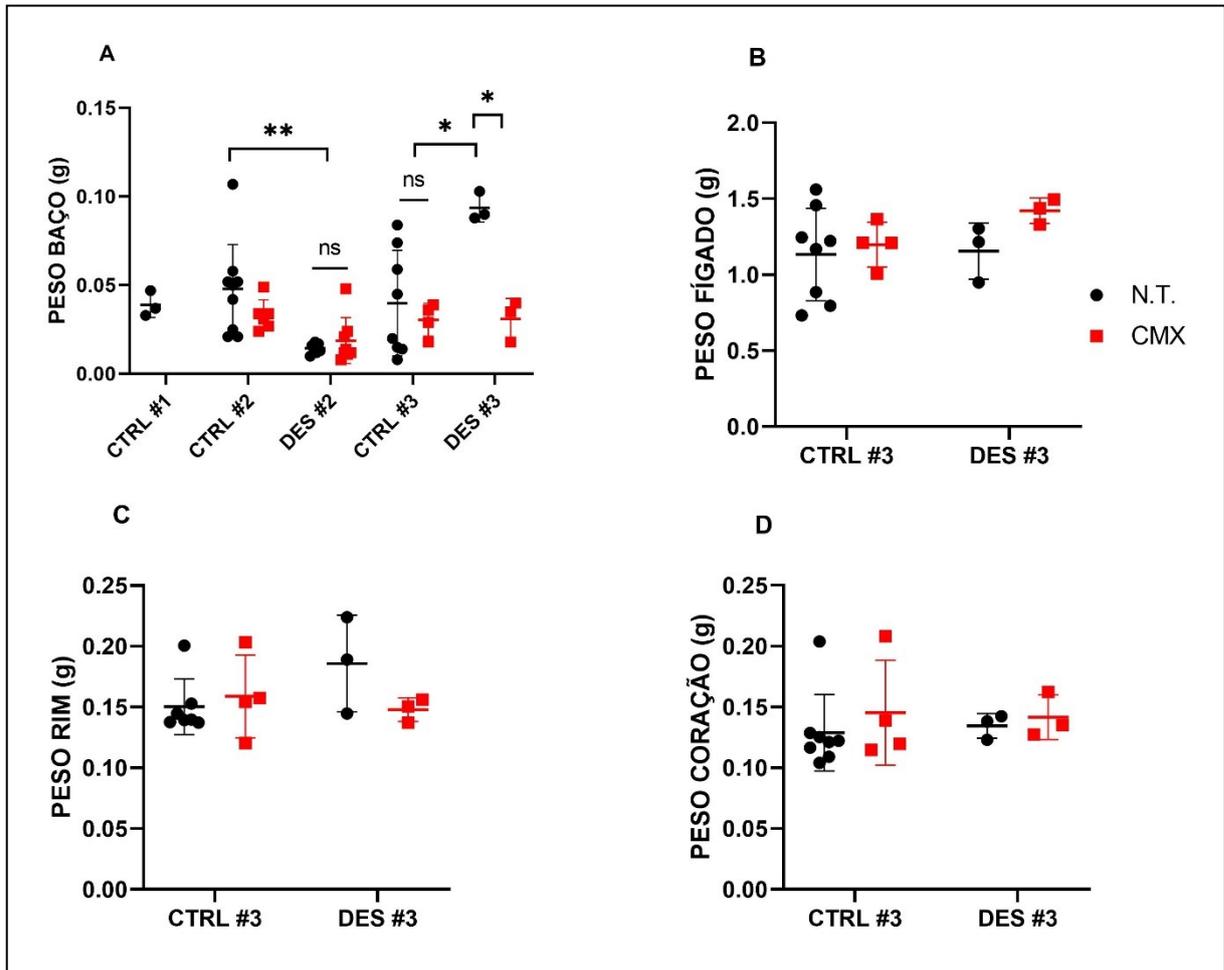
CMX ($0,031 \pm 0,009$ g) e nem DES + CMX ($0,031 \pm 0,011$ g). O grupo DES ($0,094 \pm 0,008$ g) apresentou a maior média em relação a todos os outros grupos ($p < 0,01$) (Fig. 9A). O peso do fígado após a recuperação não apresenta diferença entre os grupos CTRL ($1,133 \pm 0,304$ g), CMX ($1,198 \pm 0,147$ g), DES ($1,156 \pm 0,185$ g) e DES + CMX ($1,421 \pm 0,838$ g) (Fig. 9B). O peso do rim após a recuperação também não apresentou diferença entre os grupos CTRL ($0,150 \pm 0,023$ g), CMX ($0,159 \pm 0,034$ g), DES ($0,186 \pm 0,040$ g) e DES + CMX ($0,148 \pm 0,010$ g) (Fig. 9C). O peso do coração após a recuperação também não apresentou diferença entre os grupos CTRL ($0,129 \pm 0,031$ g), CMX ($0,145 \pm 0,043$ g), DES ($0,134 \pm 0,010$ g) e DES + CMX ($0,142 \pm 0,018$ g) (Fig. 9D).

Figura 8. Parâmetros gerais de comprimento em fêmeas



Média \pm DP dos parâmetros gerais de comprimento para fêmeas dos grupos experimentais no início do protocolo (#1), ao final do protocolo de desnutrição (#2) e após a recuperação (#3). Em preto os grupos não tratados e em vermelho os grupos tratados com Cotrimoxazol. As medidas são apresentadas em centímetros de: (A) corpo; (B) cauda; (C) intestino delgado; (D) Comprimento intestino grosso; (E) baço; (F) fêmur. Diferença não significativa (ns), * $p < 0.1$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ANOVA de duas vias, teste post hoc de Tukey. Tempo #1, n=3. Tempo #2 (CTRL n=10, CMX = 7, DES n=7, DES + CMX n=6) Tempo #3 (CTRL n=8, CMX n=4, DES n=3, DES + CMX n=3).

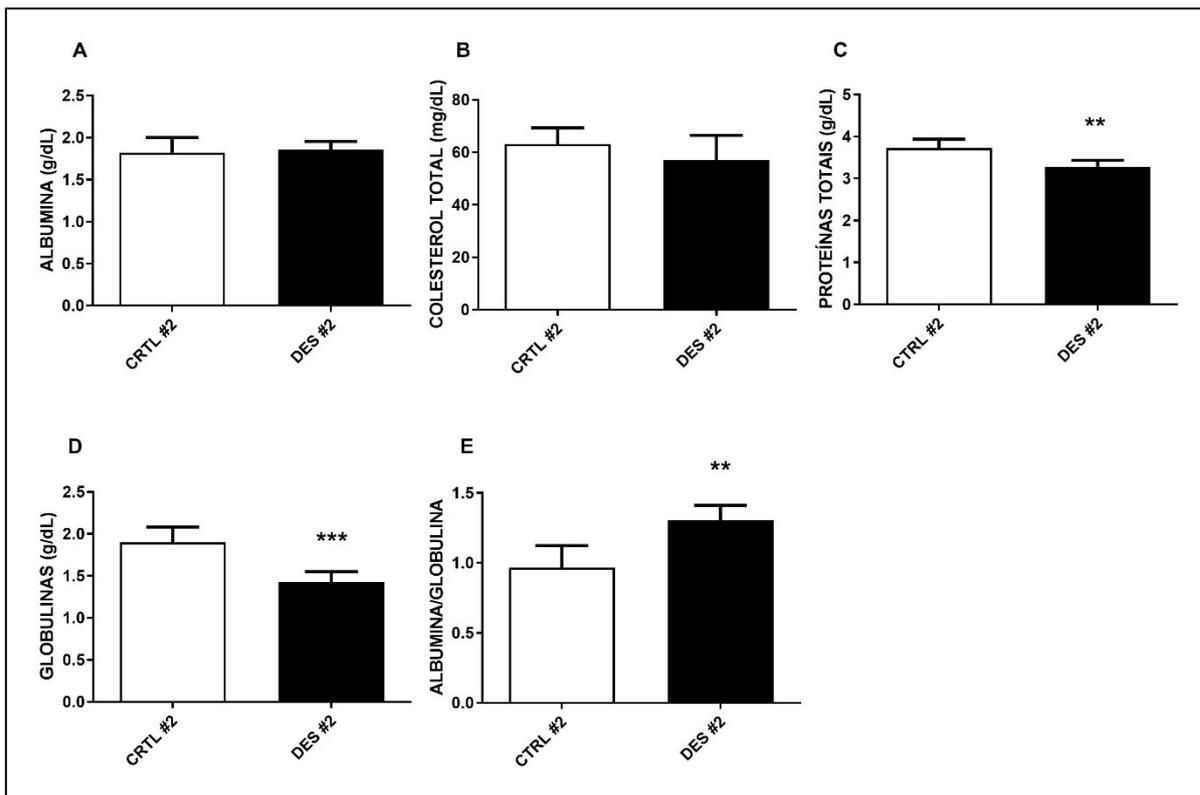
Figura 9. Parâmetros gerais de peso de órgãos em fêmeas



Média \pm DP dos parâmetros gerais de peso dos órgãos dos grupos experimentais fêmeas no início do protocolo (#1), ao final do protocolo de desnutrição (#2) e após a recuperação (#3). Em preto os grupos não tratados e em vermelho os grupos tratados com Cotrimoxazol. Os valores são apresentados em gramas de: (A) baço; (B) fígado; (C) rim; (D) coração. Diferença não significativa (ns), $*p < 0.1$, $**p < 0.001$, ANOVA de duas vias, teste post hoc de Tukey. Tempo #1, n=3. Tempo #2 (CTRL n=10, CMX = 7, DES n=7, DES + CMX n=6) Tempo #3 (CTRL n=8, CMX n=4, DES n=3, DES + CMX n=3).

Infelizmente, devido a falta de recursos, os parâmetros bioquímicos foram estabelecidos apenas para os camundongos machos CTRL e DES após o protocolo de desnutrição (Fig. 10). A albumina não foi diferente entre os grupos CTRL ($1,82 \pm 0,18$ g/dL) e DES ($1,85 \pm 0,10$ g/dL) (Fig. 10A). Não houve diferença no colesterol CTRL ($63,12 \pm 6,15$ mg/dL) e DES ($57,00 \pm 9,49$ mg/dL) (Fig. 10B). Porém as proteínas totais do grupo DES ($3,28 \pm 0,14$ g/dL) ficaram diminuídas ($p < 0.001$) em relação ao CTRL ($3,72 \pm 0,21$ g/dL) (Fig. 10C). As globulinas do grupo DES ($1,42 \pm 0,13$ g/dL) ficaram diminuídas ($p < 0.0001$) em relação ao CTRL ($1,90 \pm 0,18$ g/dL) (Fig. 10D). E por isso, a relação albumina/globulina é aumentada no grupo DES em relação ao grupo CTRL ($p < 0.001$).

Figura 10. Parâmetros bioquímicos do sangue de machos após desnutrição



Média \pm DP dos parâmetros bioquímicos do sangue de machos controle (CTRL, n=7) e desnutridos (DES, n=4) após a desnutrição #2. (A) Albumina; (B) Colesterol total; (C) Proteínas totais; (D) Globulinas; (E) Relação albumina por globulina. ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$, Teste T.

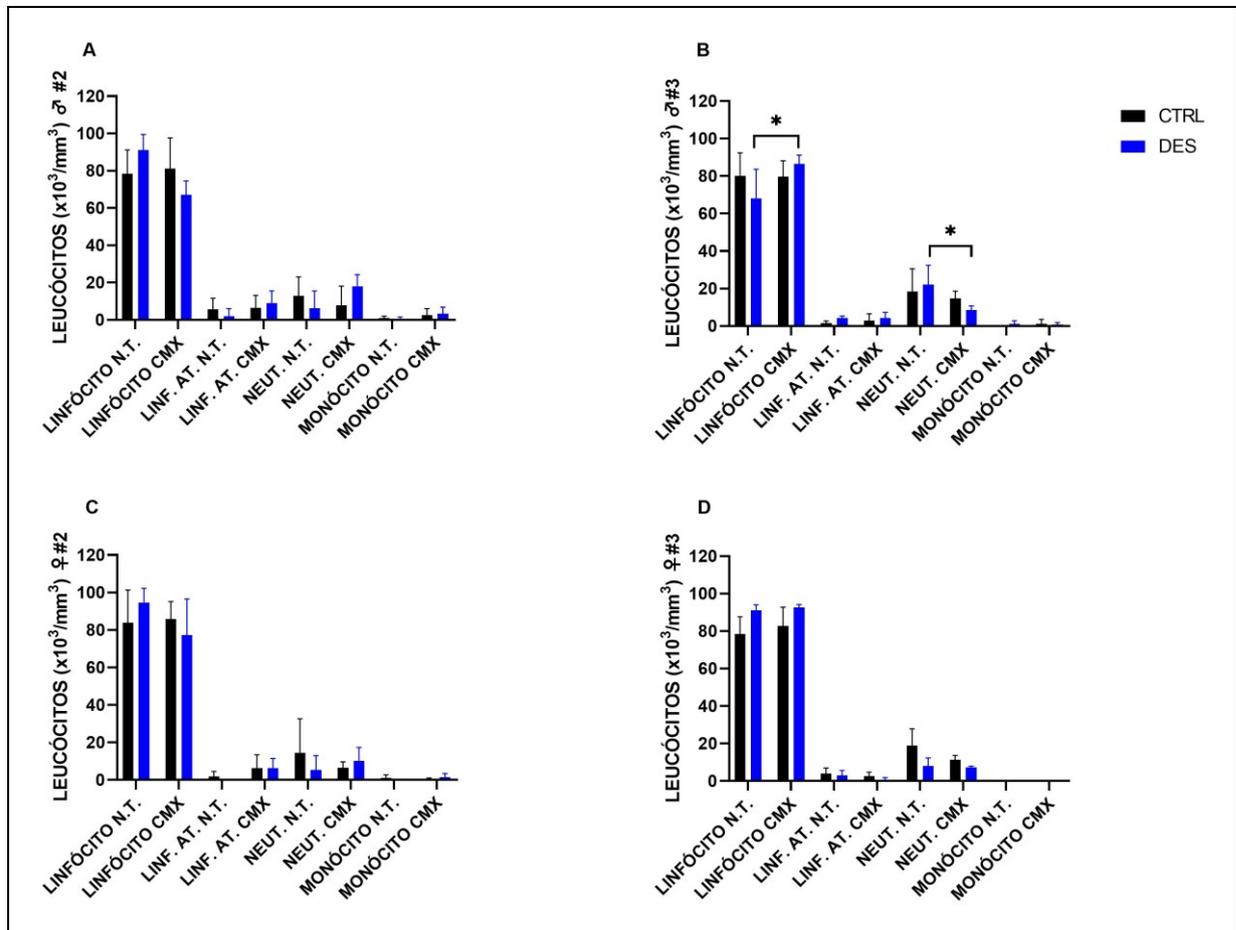
Em relação à composição celular, primeiramente foram mensurados os

leucócitos por contagem diferencial em lâmina histológica por esfregaço (Fig. 11). Machos após a desnutrição não apresentaram diferenças significativas entre todos os grupos experimentais (Fig. 11A). Os linfócitos, tipo de células mais abundante entre os identificados, tiveram médias diferentes, mas com grandes desvios nos grupos CTRL ($78,40 \pm 12,80 \times 10^3/\text{mm}^3$), CMX ($81,17 \pm 16,50 \times 10^3/\text{mm}^3$), DES CMX ($91,00 \pm 8,41 \times 10^3/\text{mm}^3$) e DES + CMX ($67,00 \pm 7,55 \times 10^3/\text{mm}^3$). Os linfócitos ativados também não foram identificados de forma homogênea entre os grupos, CTRL ($5,8 \pm 5,90 \times 10^3/\text{mm}^3$), CMX ($6,5 \pm 6,70 \times 10^3/\text{mm}^3$), DES ($2,0 \pm 4,00 \times 10^3/\text{mm}^3$) e DES + CMX ($9,00 \pm 6,56 \times 10^3/\text{mm}^3$). O mesmo se deu para os neutrófilos dos grupos CTRL ($12,80 \pm 10,28 \times 10^3/\text{mm}^3$), CMX ($7,83 \pm 10,32 \times 10^3/\text{mm}^3$), DES ($6,25 \pm 9,25 \times 10^3/\text{mm}^3$) e DES + CMX ($18,00 \pm 6,25 \times 10^3/\text{mm}^3$). E para os monócitos dos grupos CTRL ($1,0 \pm 1,0 \times 10^3/\text{mm}^3$), CMX ($2,7 \pm 3,4 \times 10^3/\text{mm}^3$), DES ($0,5 \pm 1,0 \times 10^3/\text{mm}^3$) e DES + CMX ($3,3 \pm 3,5 \times 10^3/\text{mm}^3$). Após a recuperação dos machos (#3) houve diferenças quando aos linfócitos e neutrófilos (Fig. 11B). A média dos linfócitos CTRL ($80,17 \pm 12,14 \times 10^3/\text{mm}^3$) e CMX ($68,14 \pm 15,50 \times 10^3/\text{mm}^3$) não apresentaram diferença entre os grupos, porém o grupo DES ($79,67 \pm 8,52 \times 10^3/\text{mm}^3$) foi menor ($p < 0.01$) em relação ao grupo DES + CMX ($86,43 \pm 4,76 \times 10^3/\text{mm}^3$). Os linfócitos ativados não apresentaram diferença entre os grupos CTRL ($1,5 \pm 1,22 \times 10^3/\text{mm}^3$), CMX ($2,83 \pm 3,76 \times 10^3/\text{mm}^3$), DES ($4,28 \pm 1,11 \times 10^3/\text{mm}^3$) e DES + CMX ($4,28 \pm 3,09 \times 10^3/\text{mm}^3$). Porém os neutrófilos apresentaram diferença entre os mesmos grupos que os linfócitos, mas com a relação inversa, DES ($22,14 \pm 10,30 \times 10^3/\text{mm}^3$) foram mais abundantes em relação a DES + CMX ($8,57 \pm 2,22 \times 10^3/\text{mm}^3$), os outros dois grupos CTRL ($18,33 \pm 12,24 \times 10^3/\text{mm}^3$) e CMX ($14,67 \pm 3,98 \times 10^3/\text{mm}^3$) não apresentaram diferença. Os monócitos foram encontrados em valores pequenos, e não apresentaram diferença para os grupos CTRL ($0,00 \times 10^3/\text{mm}^3$), CMX ($1,17 \pm 2,4 \times 10^3/\text{mm}^3$), DES ($1,14 \pm 1,68 \times 10^3/\text{mm}^3$) e DES + CMX ($0,71 \pm 1,11 \times 10^3/\text{mm}^3$).

Para as fêmeas não houve diferença após a desnutrição (Fig. 11C). Os linfócitos dos grupos CTRL ($83,83 \pm 17,57 \times 10^3/\text{mm}^3$), CMX ($85,75 \pm 9,39 \times 10^3/\text{mm}^3$), DES ($94,67 \pm 7,57 \times 10^3/\text{mm}^3$) e DES + CMX ($77,25 \pm 19,34 \times 10^3/\text{mm}^3$) tiveram grandes desvios. Linfócitos ativados não foram identificados no grupo DES, e apareceram de forma muito variada nos outros grupos, CTRL ($1,83 \pm 2,71$

$\times 10^3/\text{mm}^3$), CMX ($6,25 \pm 7,23 \times 10^3/\text{mm}^3$), e DES + CMX ($6,25 \pm 5,19 \times 10^3/\text{mm}^3$). Os neutrófilos também apareceram de forma variada entre as amostras, com a maior média sendo a do grupo CTRL ($14,5 \pm 18,14 \times 10^3/\text{mm}^3$), em relação aos grupos CMX ($6,5 \pm 3,10 \times 10^3/\text{mm}^3$), DES ($5,33 \pm 7,57 \times 10^3/\text{mm}^3$) e DES + CMX ($10,25 \pm 7,09 \times 10^3/\text{mm}^3$). Os monócitos não foram identificados no grupo DES e de uma maneira não homogênea nos outros grupos CTRL ($1,17 \pm 1,60 \times 10^3/\text{mm}^3$), CMX ($0,50 \pm 0,58 \times 10^3/\text{mm}^3$) e DES + CMX ($1,50 \pm 1,91 \times 10^3/\text{mm}^3$). Após recuperação ainda não são identificadas diferenças entre os tratamentos (Fig. 11D). Os linfócitos, ainda são o tipo celular mais abundante entre os grupos CTRL ($78,50 \pm 9,11 \times 10^3/\text{mm}^3$), CMX ($82,67 \pm 10,12 \times 10^3/\text{mm}^3$), e DES ($91,00 \pm 3,00 \times 10^3/\text{mm}^3$) e DES + CMX ($92,67 \pm 1,53 \times 10^3/\text{mm}^3$). Os linfócitos ativados estão presentes nos grupos CTRL ($4,00 \pm 2,97 \times 10^3/\text{mm}^3$), CMX ($2,67 \pm 2,08 \times 10^3/\text{mm}^3$), e DES ($3,00 \pm 2,65 \times 10^3/\text{mm}^3$) e DES + CMX ($0,67 \pm 1,15 \times 10^3/\text{mm}^3$). Os neutrófilos também estão presentes nos grupos CTRL ($18,83 \pm 9,06 \times 10^3/\text{mm}^3$), CMX ($11,33 \pm 2,30 \times 10^3/\text{mm}^3$), e DES ($8,00 \pm 4,36 \times 10^3/\text{mm}^3$) e DES + CMX ($7,33 \pm 0,58 \times 10^3/\text{mm}^3$). Não foram identificados monócitos nas amostras.

Figura 11. Leucograma de machos e fêmeas após o protocolo desnutrição e recuperação

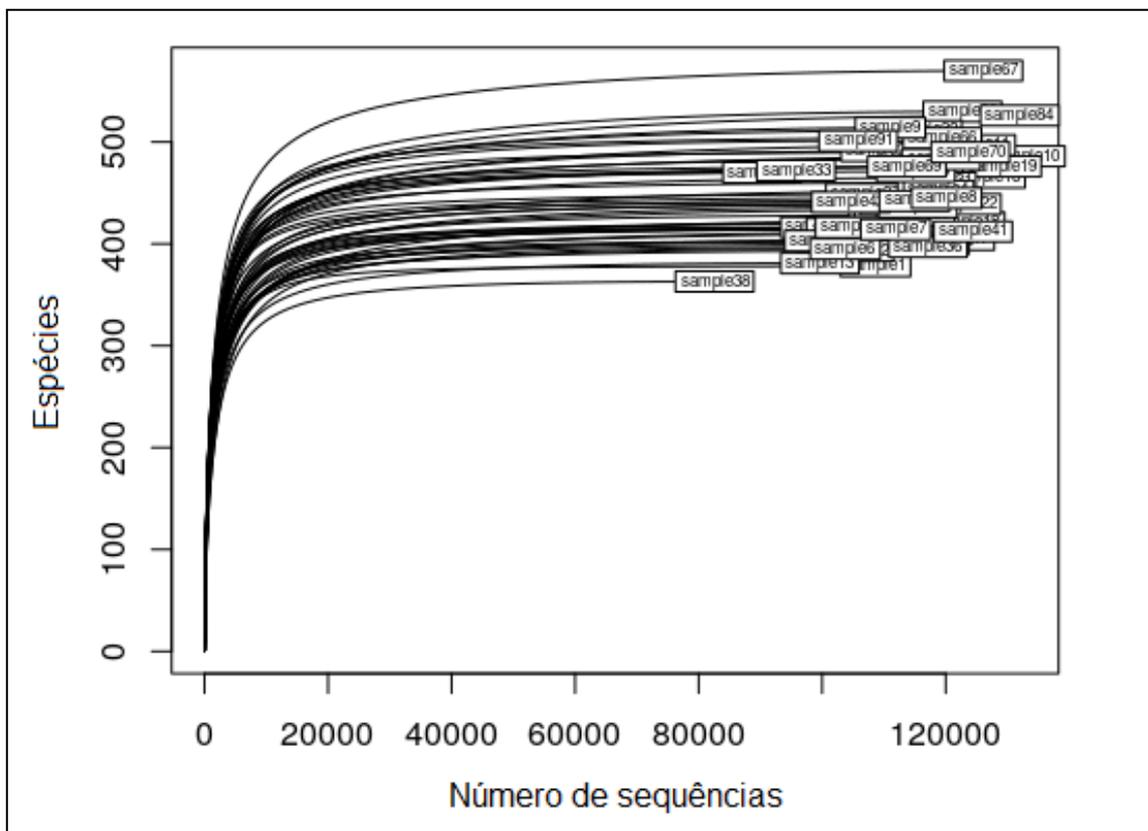


Média \pm DP da contagem diferencial de leucócitos dos grupos experimentais ao final do protocolo de desnutrição (#2) e após a recuperação (#3) representados em números absolutos por milímetro cúbico. Em azul os grupos tratados submetidos ao protocolo de desnutrição. (A) Machos #2. (B) Machos #3. (C) Fêmeas #2. (D) Fêmeas #3. * $p < 0.1$, Anova de duas vias, teste post hoc de Tukey. Machos #2 (CTRL n=5, CMX=6, DES n=4, DES + CMX n=3). Fêmeas #2 (CTRL n=6, CMX=4, DES n=3, DES + CMX n=4). Machos #3 (CTRL n=6, CMX n=6, DES n=7, DES + CMX n=7). Fêmeas #3 (CTRL n=6, CMX n=3, DES n=3, DES + CMX n=3)

A avaliação da composição do bacterioma foi realizada através de sequenciamento por síntese, na plataforma Illumina. No total foram sequenciadas 42 amostras de machos e fêmeas. As amostras de machos para cada tempo experimental foram: #1 – CTRL (n=3); tempo experimental #2 – CTRL (n=3), DES (n=3), CMX e DES+CMX (n=3); tempo experimental #3 – CTRL (n=3), DES (n=3), CMX e DES+CMX (n=3). Para as fêmeas não houve sequenciamento do último tempo experimental, sendo sequenciado somente: tempo experimental #1 – CTRL (n=3); tempo experimental #2 – CTRL (n=3), DES (n=3), CMX e DES+CMX (n=3).

O sequenciamento gerou aproximadamente 4.7 milhões de leituras (*reads*), com uma média de 112.253,74 leituras por amostra. Essas sequências foram classificadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs), e em média, foram identificadas 436,30 OTUs por amostra. A curva de rarefação de todas as amostras atingiu um platô, o que demonstra que o sequenciamento apresentou uma boa cobertura quanto a riqueza de espécies (Fig. 12).

Figura 12. Curva de rarefação do sequenciamento



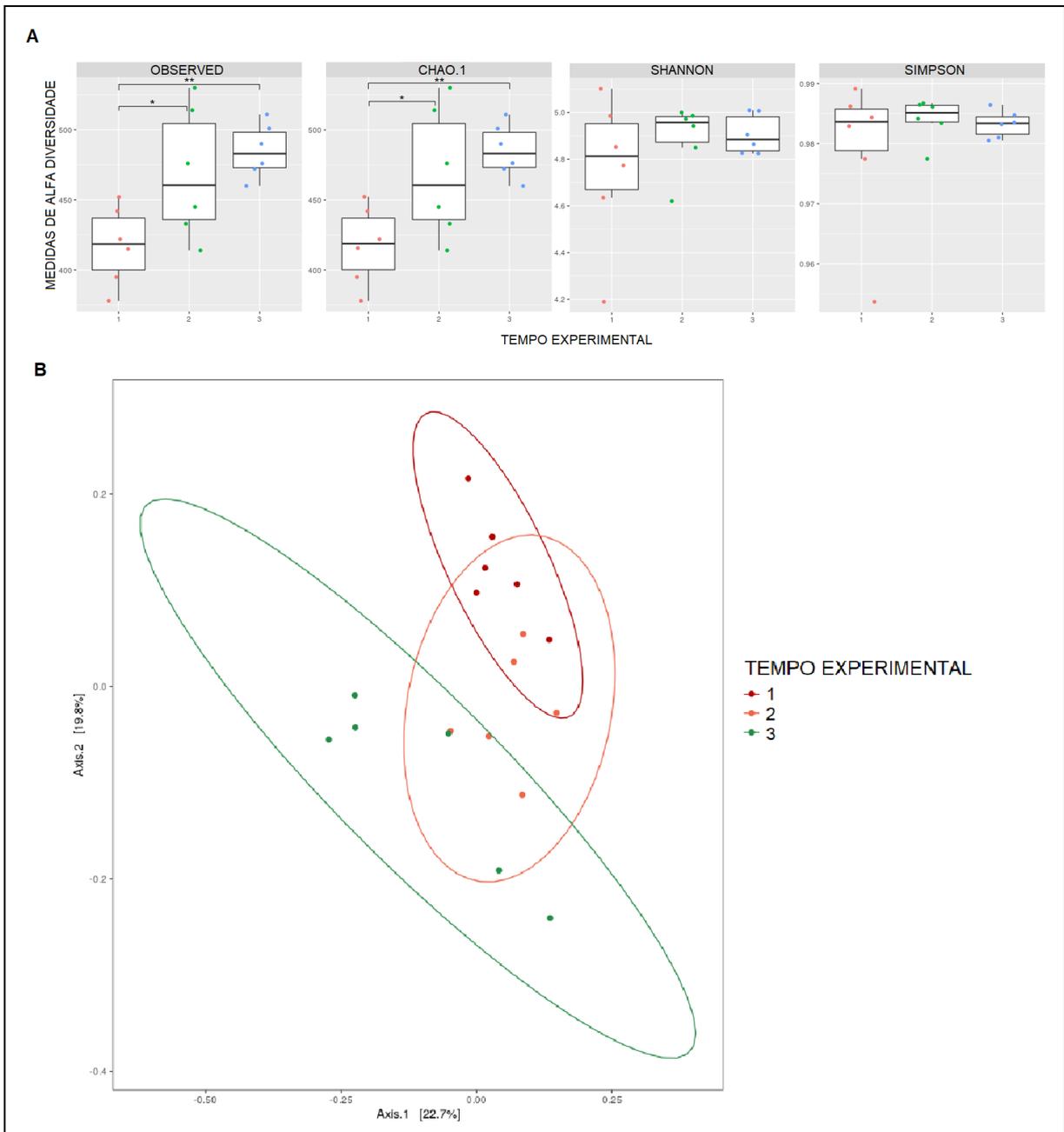
Curva de rarefação de todas as amostras do sequenciamento. Número de espécies identificadas pelo número de sequências.

As OTUs geradas foram identificadas a partir do banco de dados SILVA, e com isso, foi feita a avaliação da composição da microbiota dos animais. Em um primeiro momento, essa avaliação buscou a diferença entre os tempos experimentais, utilizando somente os animais controles, sem distinção de sexo (Fig. 13). Pode-se observar com isso que o bacterioma dos animais tinha sua riqueza aumentada conforme os animais amadurecem (Fig. 13A). Para observar a riqueza, diversidade-alfa, foram utilizados 4 índices: Observed, Chao1, Shannon e Simpson. Para os índices Observed e Chao1, houve um aumento significativo da média nos

tempos experimentais #2 e #3 em relação ao tempo #1. A média para #1 foi de 417.33 e 417.48, respectivamente para Observed e Chao1. No tempo #2, foi 468.67 e 468.73 ($p=0.0421$ para Observed e $p=0.0426$ para Chao1). E no tempo #3 foi 485.00 e 485.09 3 ($p=0.0078$ para Observed e $p=0.0079$ para Chao1).

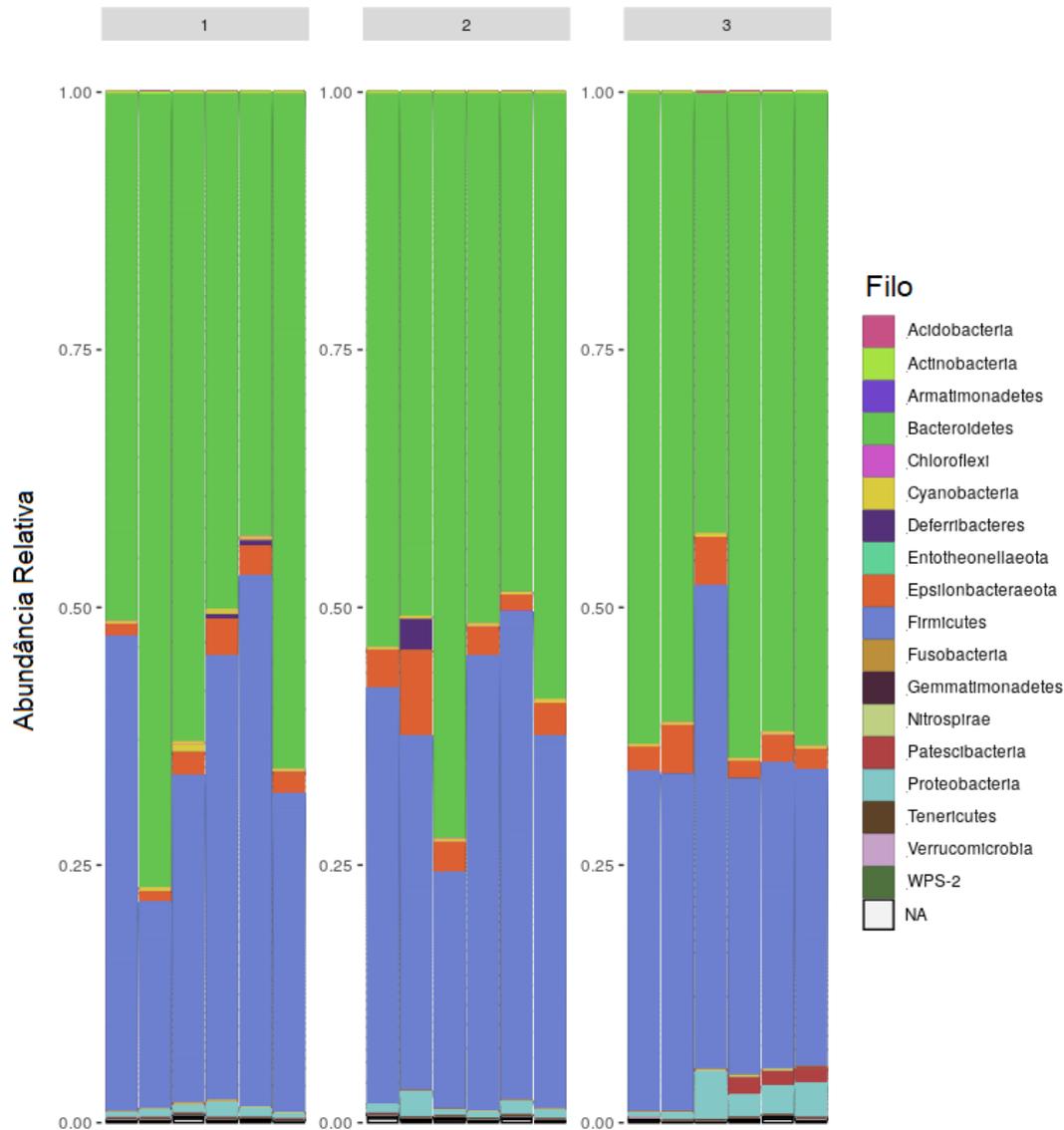
A homogeneidade foi comparada entre os tempos experimentais. Para isso, utilizou-se a dispersão beta, que avalia a distância dos pontos em relação ao centroide. E nesse ponto não há diferença entre os tempos experimentais. Porém, utilizando da análise de variância por permutação usando distância de matrizes (ADONIS) ($p<0.002$), percebemos que os centroides dos grupos estão localizados em diferentes posições. Então, apesar dos grupos apresentarem um número homogêneo de espécies, a composição dos grupos difere (Fig. 13B). A abundância relativa permitiu a identificação da representação dos filos, bem como sua modulação com o envelhecimento dos animais. Os filos Bacteroidetes e Firmicutes foram os dois filos mais representados em todos os tempos experimentais, com Bacteroidetes sendo o maior entre os dois (Fig. 14). O grupo Epsilonproteobacteria também esteve presente em todos os tempos experimentais. No tempo #3 há um aumento da abundância relativa das Proteobacterias e Patescibacteria (Fig. 14).

Figura 13. A microbiota intestinal dos animais não está completamente madura no início do protocolo de desnutrição



Riqueza, diversidade e abundância relativa de OTUs identificadas em amostras de fezes de animais controle, machos (n=3) e fêmeas (n=3), nos três tempos experimentais (#1, #2, #3). **(A)** Diagrama de caixa representando medidas de diversidade alfa (índices: Observed, Chao1, Shannon, Simpson) nos tempos experimentais 1 (vermelho), 2 (verde) e 3 (azul). **(B)** Análise de Coordenadas Principais dos índices de diversidade de Bray-Curtis para os animais nos tempos experimentais 1 (vermelho), 2 (laranja) e 3 (verde). * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ Anova de uma via, teste post hoc de Tukey.

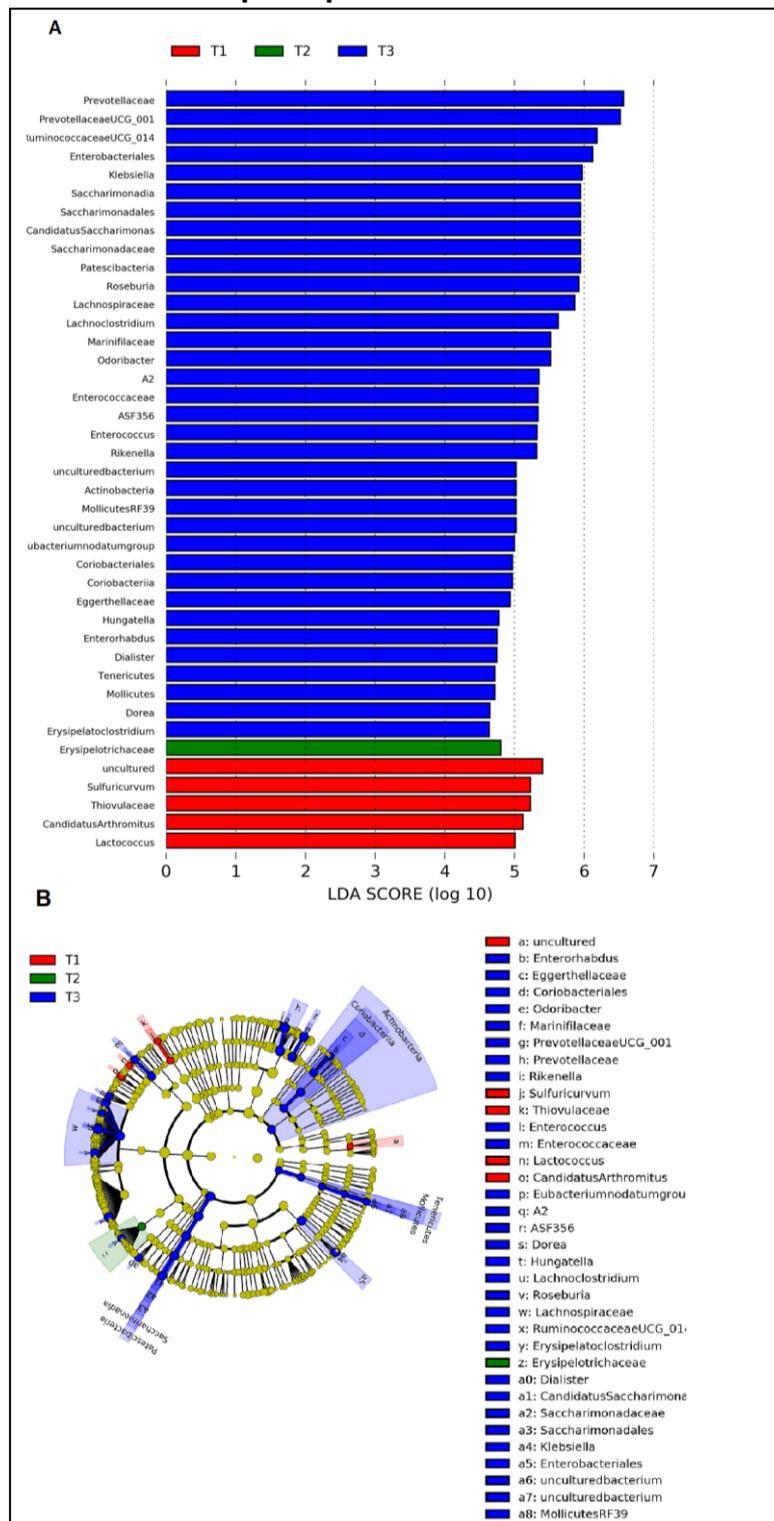
Figura 14. Abundância relativa dos filos da microbiota intestinal dos animais controle nos três tempos experimentais



Abundância Relativa de Filos de machos (n=3) e fêmeas (n=3), nos três tempos experimentais (#1, #2, #3).

Utilizando da análise discriminante linear (LDA) com efeito de tamanho (LEfSe) proposta por Segata (2011), foi possível identificar táxons aumentados de forma significativa em cada tempo experimental (Fig. 15). Os camundongos mais jovens, do tempo experimental #1, apresentaram 4 táxons aumentados em relação aos outros dois tempos, o tempo #2 apresentou um único táxon. Já o último tempo experimental, #3, onde os animais se encontram mais velhos, apresentou a maior quantidade de táxons aumentados, no total foram 33 táxons identificados (Fig. 15A).

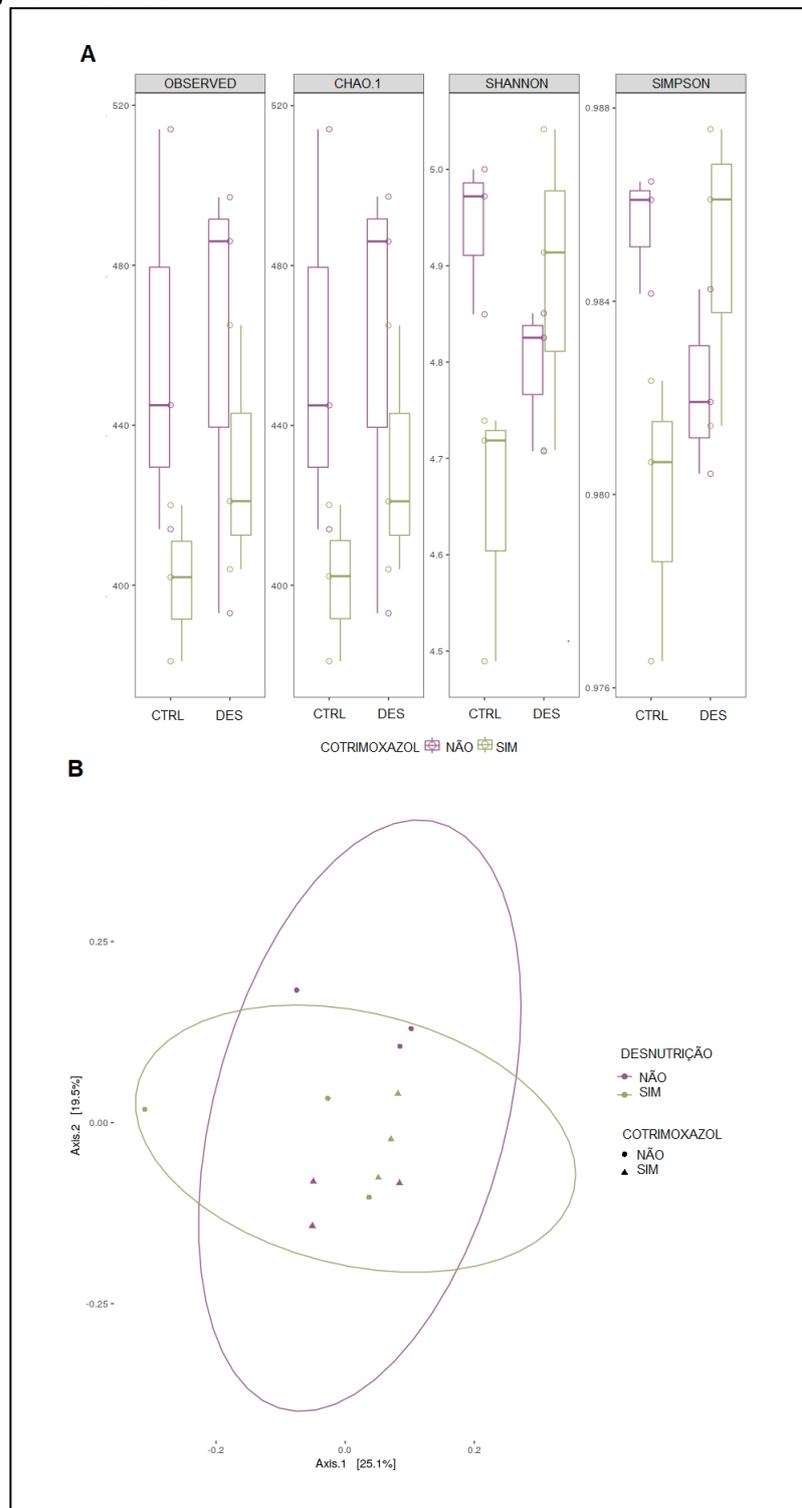
Figura 15. Grupos de bactérias da microbiota intestinal de animais controle expandidos em cada tempo experimental



Táxons de bactérias aumentados em animais controle, machos (n=3) e fêmeas (n=3), nos tempos experimentais: #1 (vermelho), #2 (verde), #3 (azul). **(A)** Análise discriminante linear e ordenados por tamanho de efeito utilizando o método LEfSe demonstrando o aumento significativo de táxons em escala logarítmica. **(B)** Cladograma dos táxons bacterianos indicando a relação filogenética entre os táxons aumentados em cada tempo experimental.

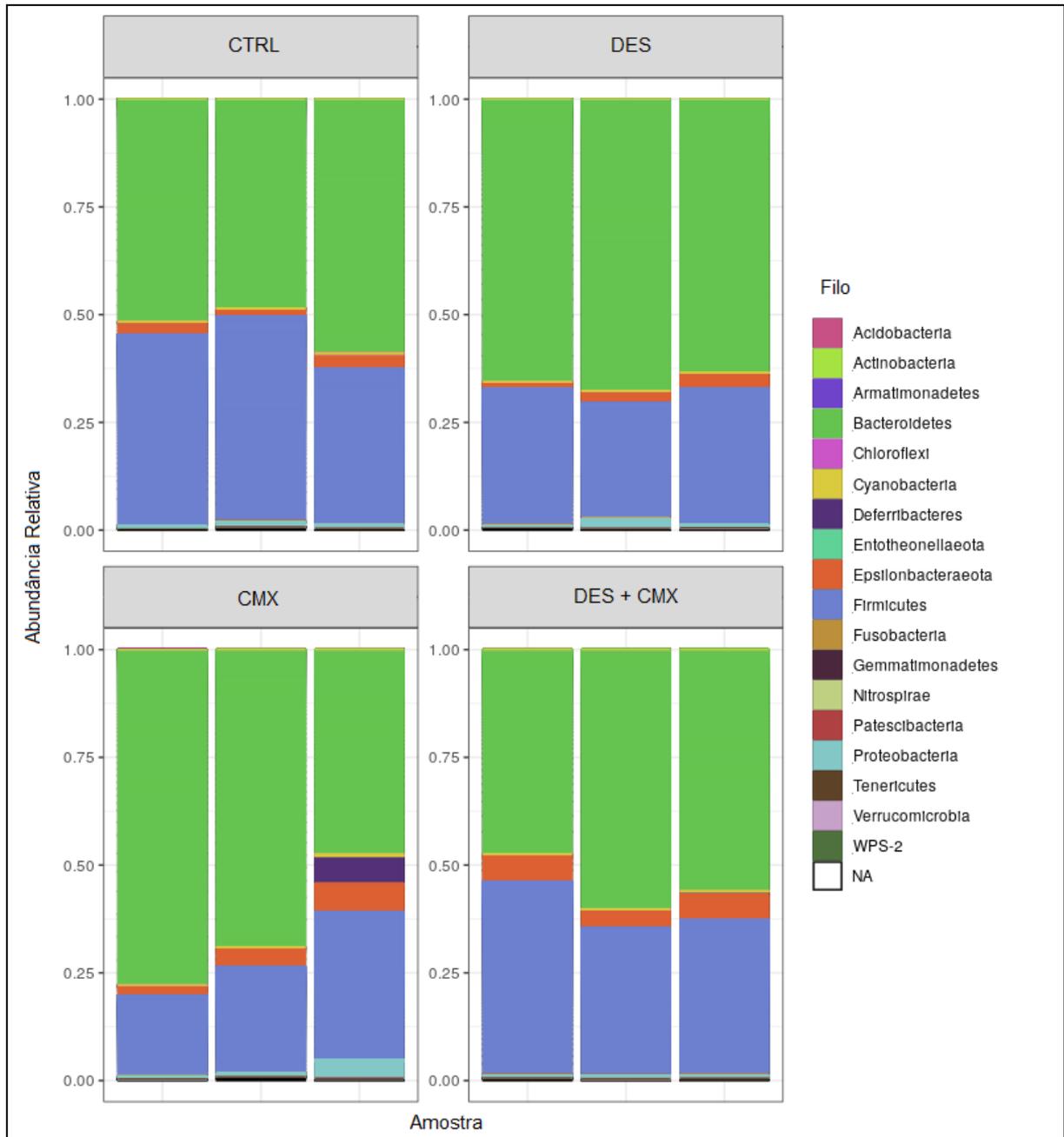
Após a análise do desenvolvimento normal da microbiota através do tempo, procurou-se estabelecer as mudanças ocasionadas pelos protocolos de desnutrição e administração de antimicrobiano. Os dois modificaram o bacterioma de animais machos tanto em relação a diversidade (Fig. 16) quanto para abundância relativa (Fig. 17), o mesmo foi observado na diversidade (Fig. 20) e abundância relativa (Fig. 21) de fêmeas. Entretanto, a mudança não foi observada em relação ao número de espécies, ainda que o tratamento com Cotrimoxazol apresentou as menores médias para os índices de diversidade alfa, os grupos não tiveram diferenças significativas para nenhum dos sexos (Fig. 16A e 20A). A homogeneidade e a posição dos centroides para análise da diversidade beta também não apresentaram diferença estatística para machos (Fig 16B). Porém, houve diferença sim para fêmeas, com centróides bem diferentes, com o efeito do antibiótico sendo mais significativo ($p < 0.003$) em relação a desnutrição ($p < 0.016$) (Fig. 20B). Nos dois sexos a relação Firmicutes/Bacteroidetes foi modificada, com a expansão do último. Esse efeito é agravado com o uso de Cotrimoxazol. Porém, o grupo que é fig. (Fig. 17 e 21C).

Figura 16. O uso de Cotrimoxazol não atua na diversidade microbiana dos camundongos machos



Riqueza, diversidade de OTUs identificadas pelo sequenciamento por síntese em amostras de animais machos após desnutrição (#2) dos grupos CTRL (n=3), DES (n=3), CMX (n=3), DES + CMX (n=3). **(A)** Diagrama de caixa representando medidas de diversidade alfa (Observed, Chao1, Shannon, Simpson). **(B)** Análise de Coordenadas Principais dos índices de diversidade de Bray-Curtis.

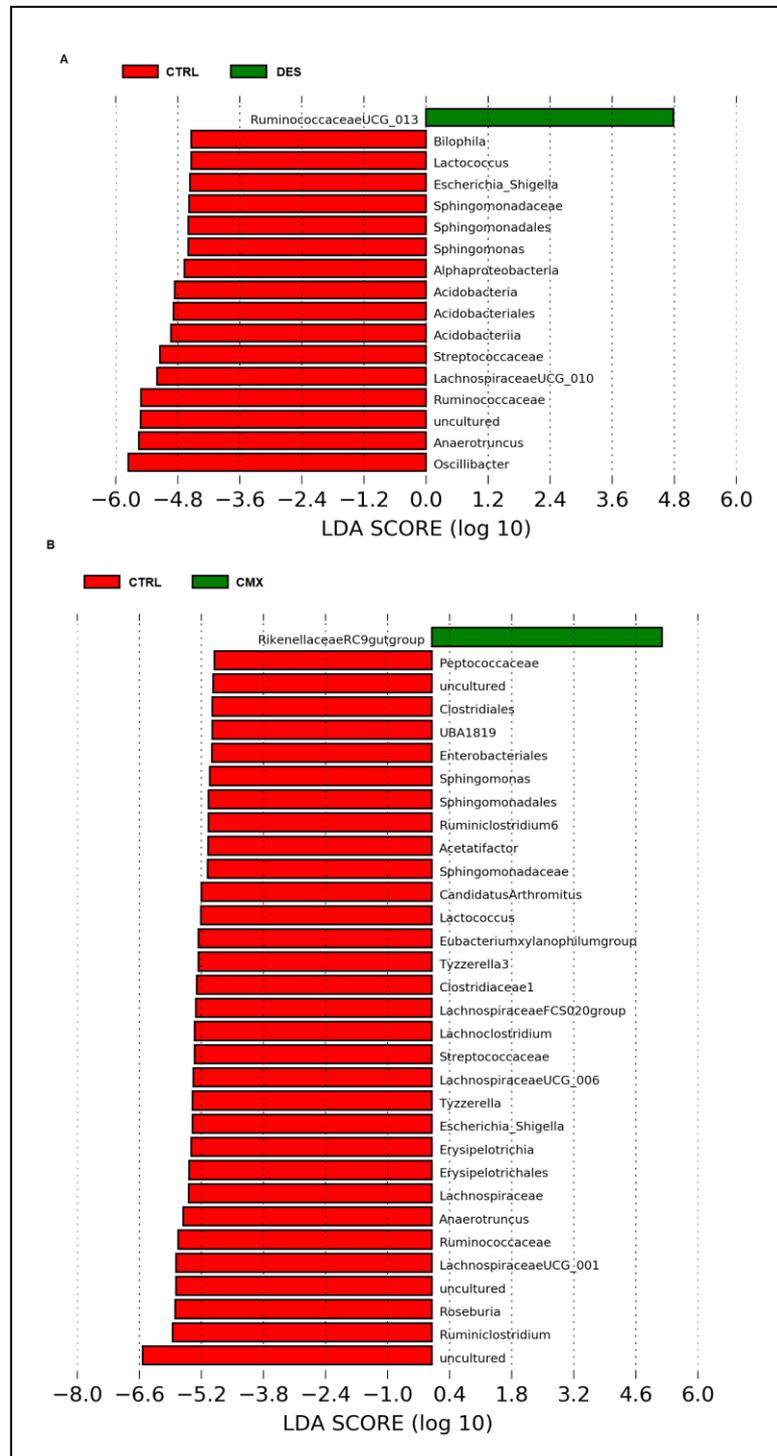
Figura 17. A relação Firmicutes/Bacteroidetes é alterada pelo protocolo de desnutrição e tratamento com Cotrimoxazol em camundongos machos



Abundância Relativa de filós nas amostras de animais machos após desnutrição (#2) dos grupos CTRL (n=3), DES (n=3), CMX (n=3), DES + CMX (n=3).

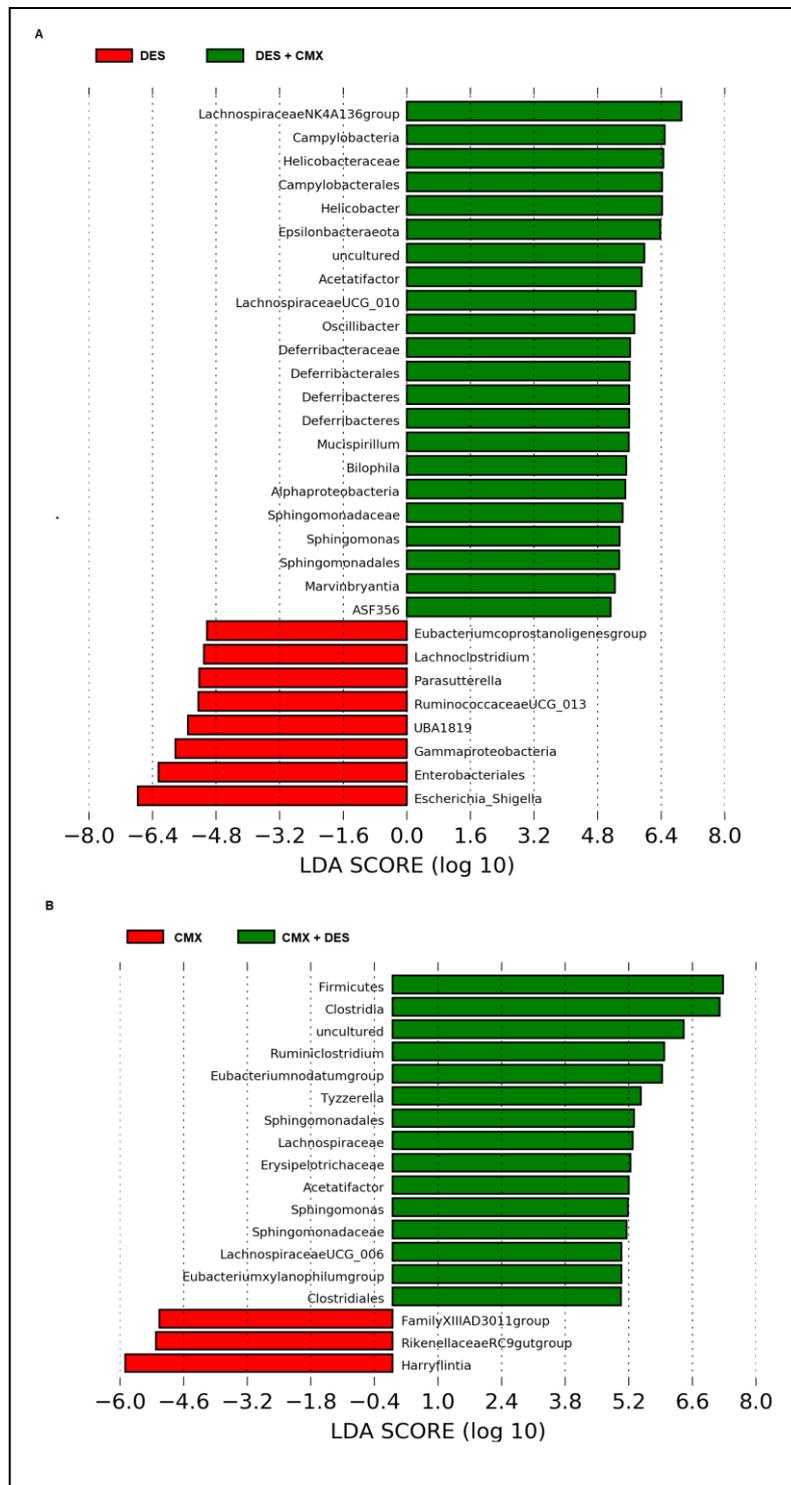
Devido aos diferentes impactos que os tratamentos ocasionam em cada sexo, as análises por método LEfSe foram realizadas para machos (Fig. 18 e 19) e para fêmeas (Fig. 22 e 23). Machos, logo após a finalização do protocolo de desnutrição e tratamento com antimicrobiano, apresentam diminuição de diferentes táxons em relação ao grupo controle. O tratamento com Cotrimoxazol resultou na redução de 31 OTUs, enquanto para a desnutrição esse número foi de 16 OTUs. Os dois tratamentos possibilitaram a expansão de um único grupo. No caso do antimicrobiano foi a expansão de um gênero incultivável da família Rikenellaceae, conhecido como *RC9 gut group*. Para a desnutrição foi o grupo Ruminococcaceae UCG-005. As fêmeas por sua vez, apresentaram um resultado curioso. Os dois protocolos apresentaram um aumento no número de espécies em relação ao controle (Fig. 22). A desnutrição aumentou 21 OTUs em contraposição com a controle que apresentou somente 3 OTUs aumentadas. Enquanto o antimicrobiano aumentou 29 OTUs, e nenhum aumento do grupo controle. O grupo duplo tratado (DES + CMX) foi comparado em relação ao aumento e diminuição de espécies com os grupos que passaram por um dos tratamentos (Fig. 23). Para os dois sexos, o duplo tratado apresentou o maior número de espécies aumentadas.

Figura 18. O uso de Cotrimoxazol reduz um maior número de espécies da microbiota intestinal do que a desnutrição em camundongos machos



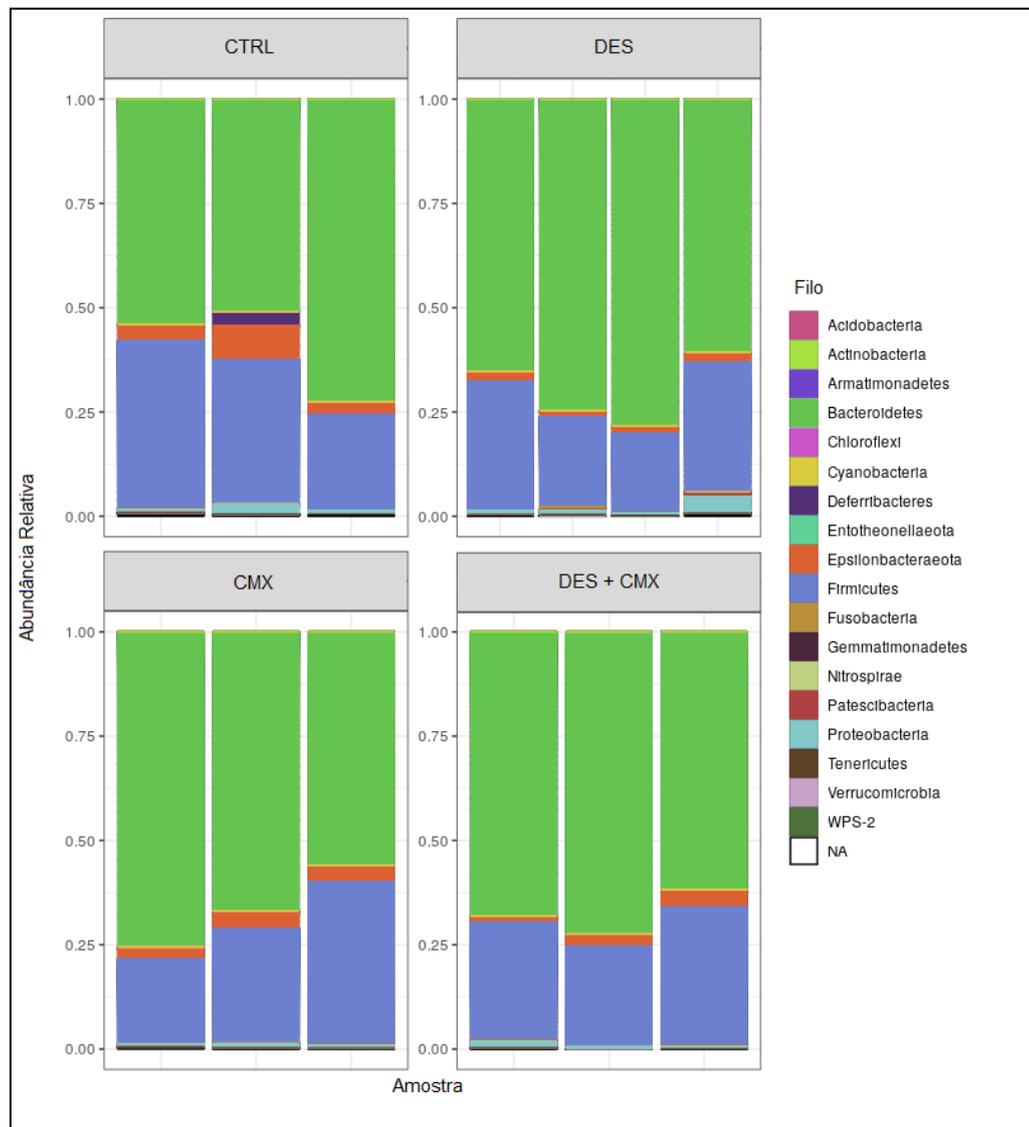
Análise discriminante linear e ordenados por tamanho de efeito utilizando o método LefSe demonstrando o aumento significativo de táxons em escala logarítmica. Táxons de bactérias aumentados em amostras de machos CTRL (n=3), CMX (n=3), DES (n=3) no tempo experimental #2. Comparação entre grupos: **(A)** Controle e Desnutrido e **(B)** Controle e Cotrimoxazol.

Figura 19. O tratamento com Cotrimoxazol em camundongos machos desnutridos mitiga os efeitos da redução de espécies na microbiota intestinal



Análise discriminante linear e ordenados por tamanho de efeito utilizando o método LEfSe demonstrando o aumento significativo de táxons em escala logarítmica. Táxons de bactérias aumentados em amostras de machos CMX (n=3), DES (n=3) e DES + CMX (n=3) no tempo experimental #2. Comparação entre grupos: (A) Desnutridos e Desnutrido + Cotrimoxazol e (B) Cotrimoxazol e Desnutrido + Cotrimoxazol.

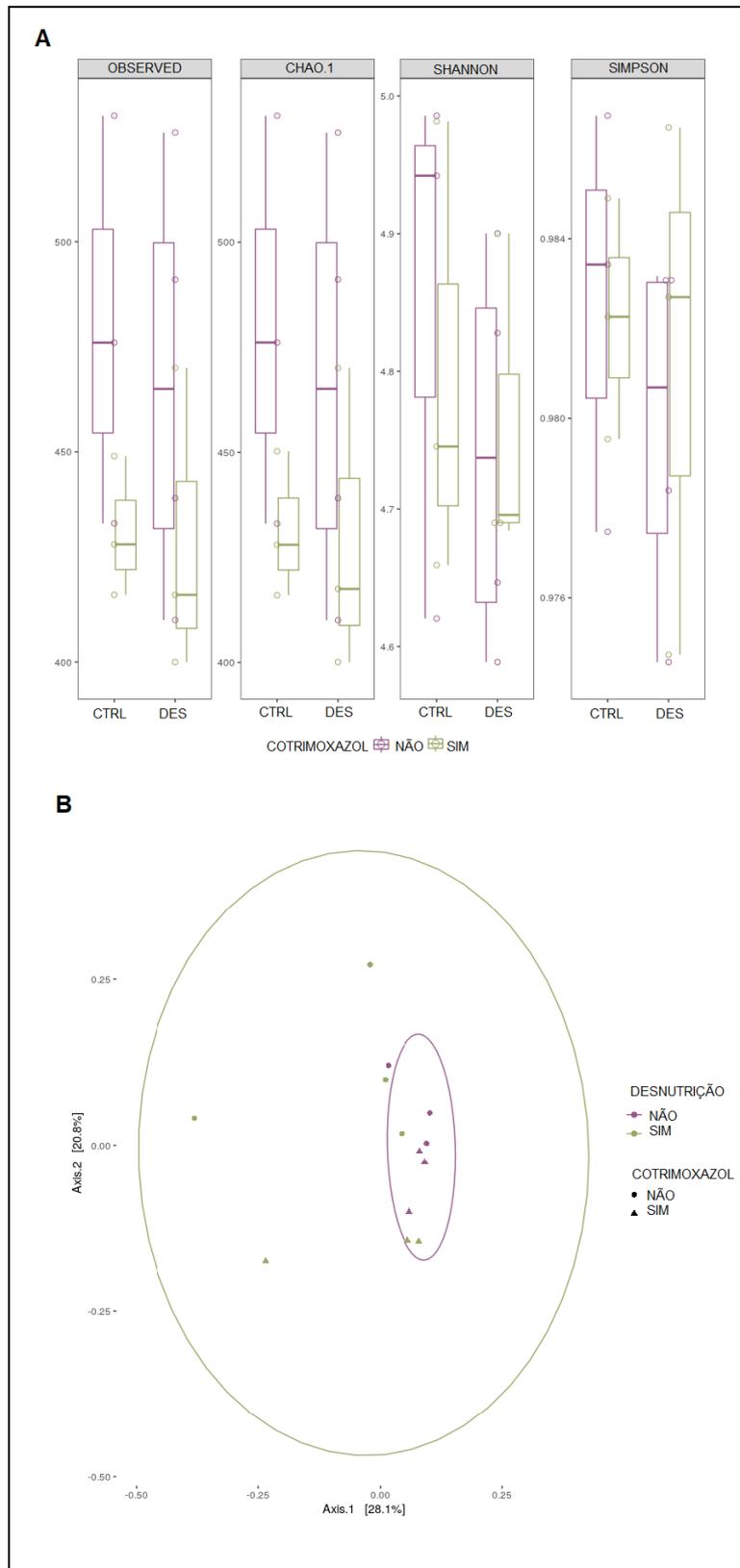
Figura 20. A diversidade da microbiota intestinal é pouco alterada em fêmeas



após protocolo de desnutrição e de uso de Cotrimoxazol

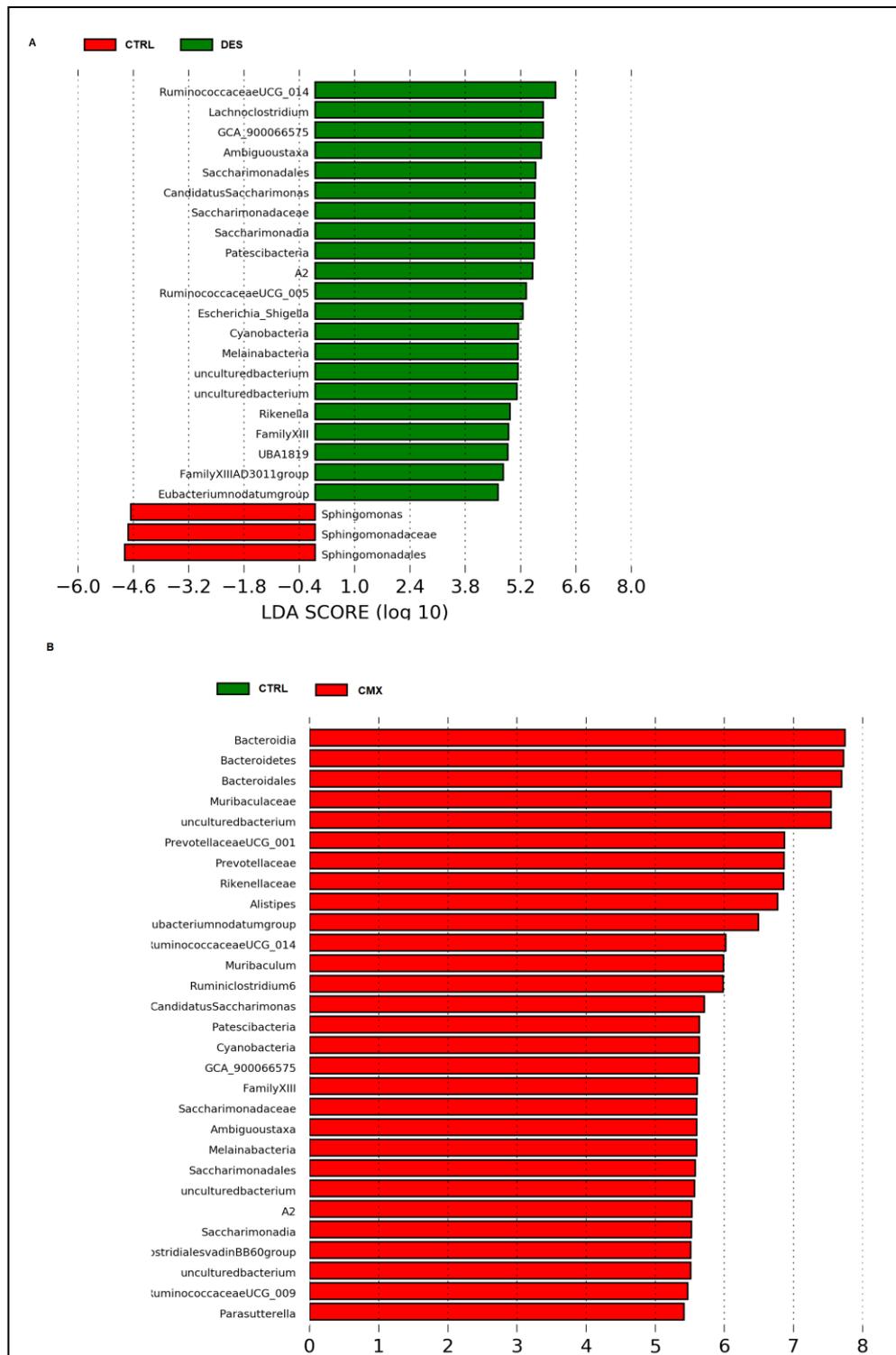
Riqueza, diversidade e abundância de OTUs identificadas pelo sequenciamento por síntese em amostras de animais fêmeas após a desnutrição (#2) dos grupos CTRL (n=3), DES (n=4), CMX (n=3), DES + CMX (n=3). (A) Diagrama de caixa representando medidas de diversidade alfa (Observed, Chao1, Shannon, Simpson). (B) Análise de Coordenadas Principais dos índices de diversidade de Bray-Curtis.

Figura 21. A relação Firmicutes/Bacteroidetes é alterada pelo protocolo de desnutrição e tratamento com Cotrimoxazol em camundongos fêmeas



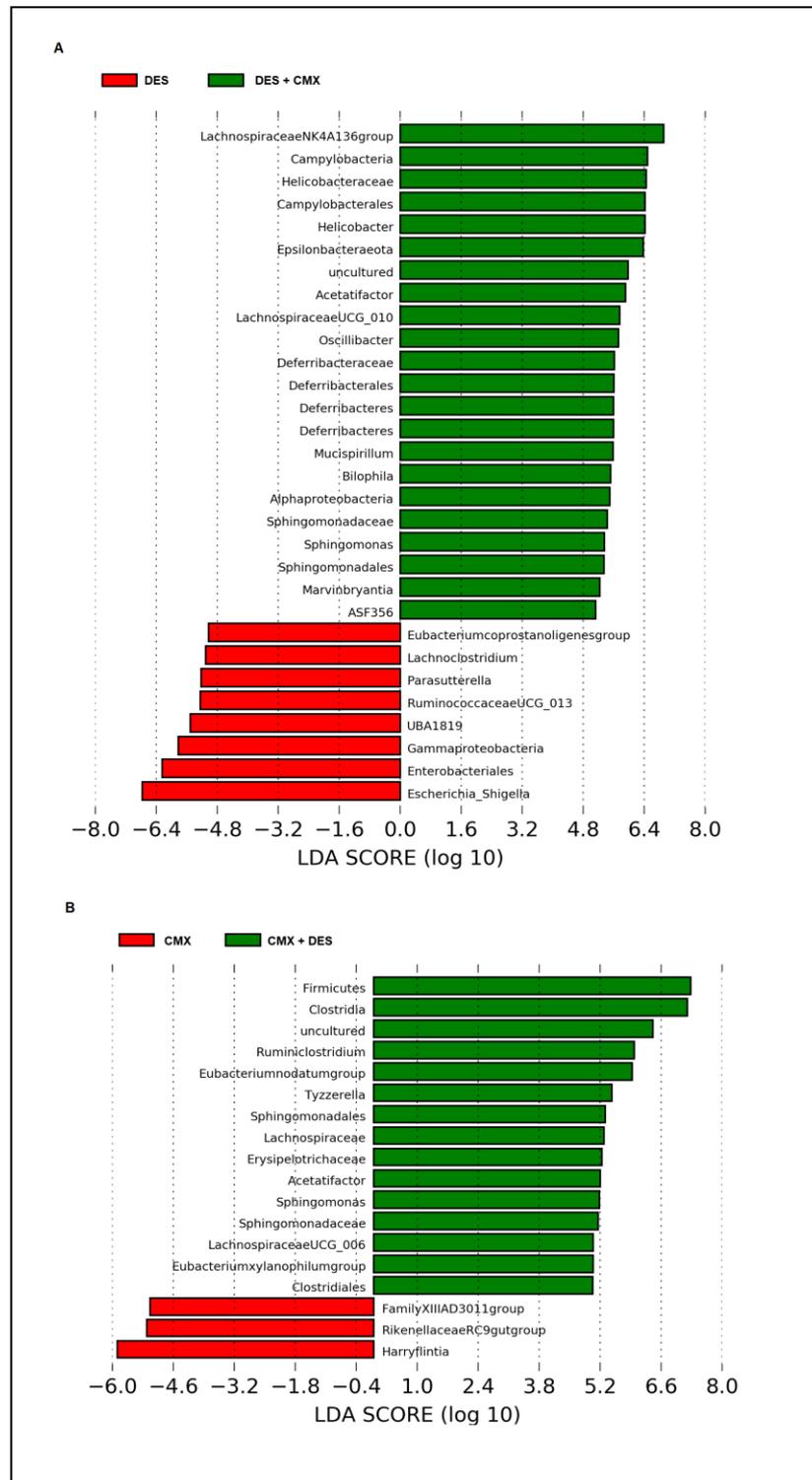
Abundância Relativa de filamentos nas amostras de animais fêmeas após desnutrição (#2) dos grupos CTRL (n=3), DES (n=4), CMX (n=3), DES + CMX (n=3).

Figura 22. A desnutrição e o uso de Cotrimoxazol aumentaram os grupos microbianos compoendo a microbiota intestinal de fêmeas



Análise discriminante linear e ordenados por tamanho de efeito utilizando o método LEfSe demonstrando o aumento significativo de táxons em escala logarítmica. Táxons de bactérias aumentados em amostras de fêmeas CTRL (n=3), CMX (n=3), DES (n=4) no tempo experimental #2. Comparação entre grupos: (A) Controle e Desnutrido, (B) Controle e Cotrimoxol.

Figura 23. O tratamento com Cotrimoxazol mitiga os efeitos da redução de espécies na microbiota intestinal causados pela desnutrição em fêmeas

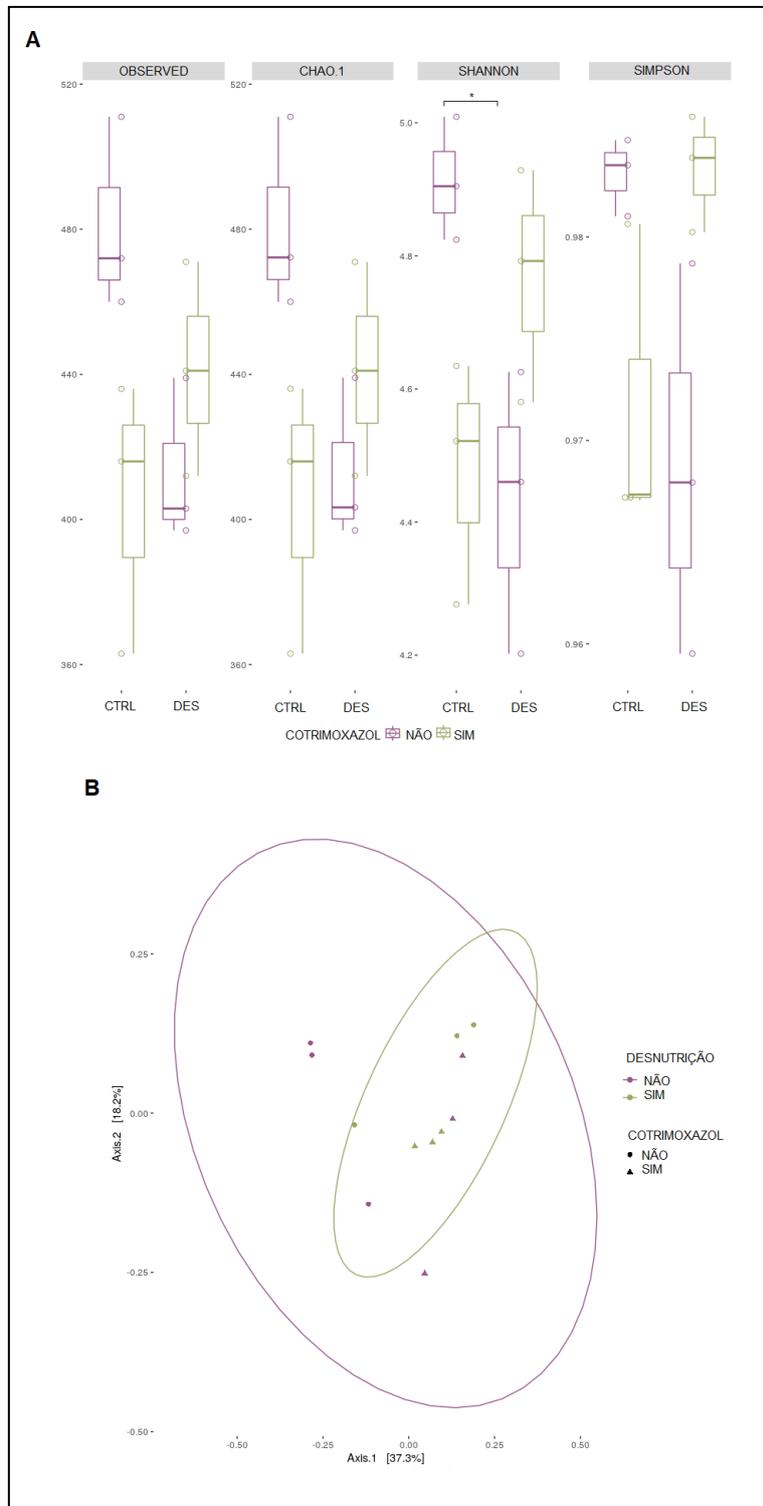


Análise discriminante linear e ordenados por tamanho de efeito utilizando o método LefSe demonstrando o aumento significativo de táxons em escala logarítmica. Táxons de bactérias aumentados em amostras de fêmeas CMX (n=3), DES (n=4) e DES + CMX (n=3) no tempo experimental #2. Comparação entre grupos: (A) Desnutrido e Desnutrido + Cotrimoxazol, (B) Cotrimoxazol e Desnutrido + Cotrimoxazol.

Após a finalização do protocolo de desnutrição aconteceu a recuperação nutricional, com o aumento gradual do volume de ração ofertado por dia durante duas semanas. Após esse período, a microbiota dos animais foi avaliada novamente. E com isso, foi observado que a recuperação nutricional não garante a recuperação do bacterioma dos animais que passaram nem pelo protocolo de desnutrição ou que foram tratados com Cotrimoxazol (Fig. 24). Os índices de diversidade alfa não apresentaram diferenças estatísticas, com exceção de Shannon em que os animais DES apresentaram menor riqueza em relação aos animais controle ($p < 0.036$) (Fig. 24A). Duas semanas após o tratamento com antimicrobiano, a diversidade beta dos animais que tratados com Cotrimoxazol apresentou o centroide diferente em relação aos outros ($p < 0.031$) (Fig. 24B). A abundância relativa dos filos manteve a proporção Firmicutes/Bacteroidetes alteradas nos animais que foram desnutridos, ou tratados com antimicrobianos (Fig. 25).

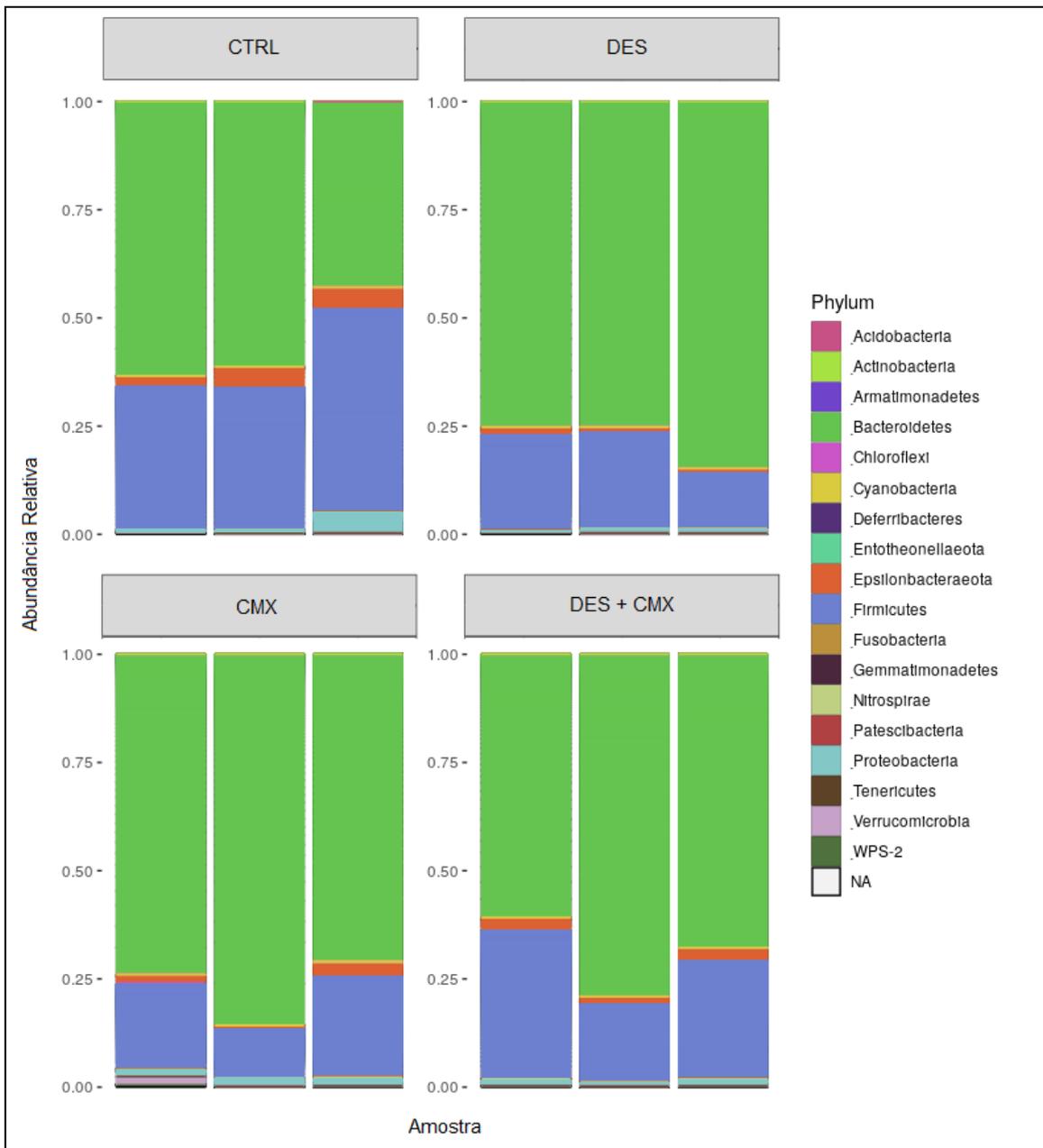
As análises por LefSe mostraram a diminuição que os tratamentos causaram mesmo após a recuperação (Fig. 26). Os animais recuperados da desnutrição apresentam a diminuição de 16 OTUs (Fig. 26A), os animais que fizeram uso de Cotrimoxazol também apresentam a diminuição de 16 OTUs em relação ao controle (Fig. 26B). Porém, diferentemente do grupo que só sofre a desnutrição, eles também apresentam 2 OTUs aumentadas, o gênero *Parasutterella* e *Family XIII AD3011 group*. O maior aumento se deu na comparação dos grupos DES, ou CMX, com DES + CMX (Fig. 27). Em comparação ao grupo desnutrido, o duplo tratamento resultou no aumento de 69 táxons no tempo #3 de avaliação, equivalente a duas semanas de finalizado o uso do antimicorbiano. Já em relação ao grupo CMX, esse número foi de 26. As duas comparações mostraram um grande aumento de Firmicutes e Clostridia.

Figura 24. A recuperação nutricional dos animais não garante a recuperação da composição da microbiota intestinal



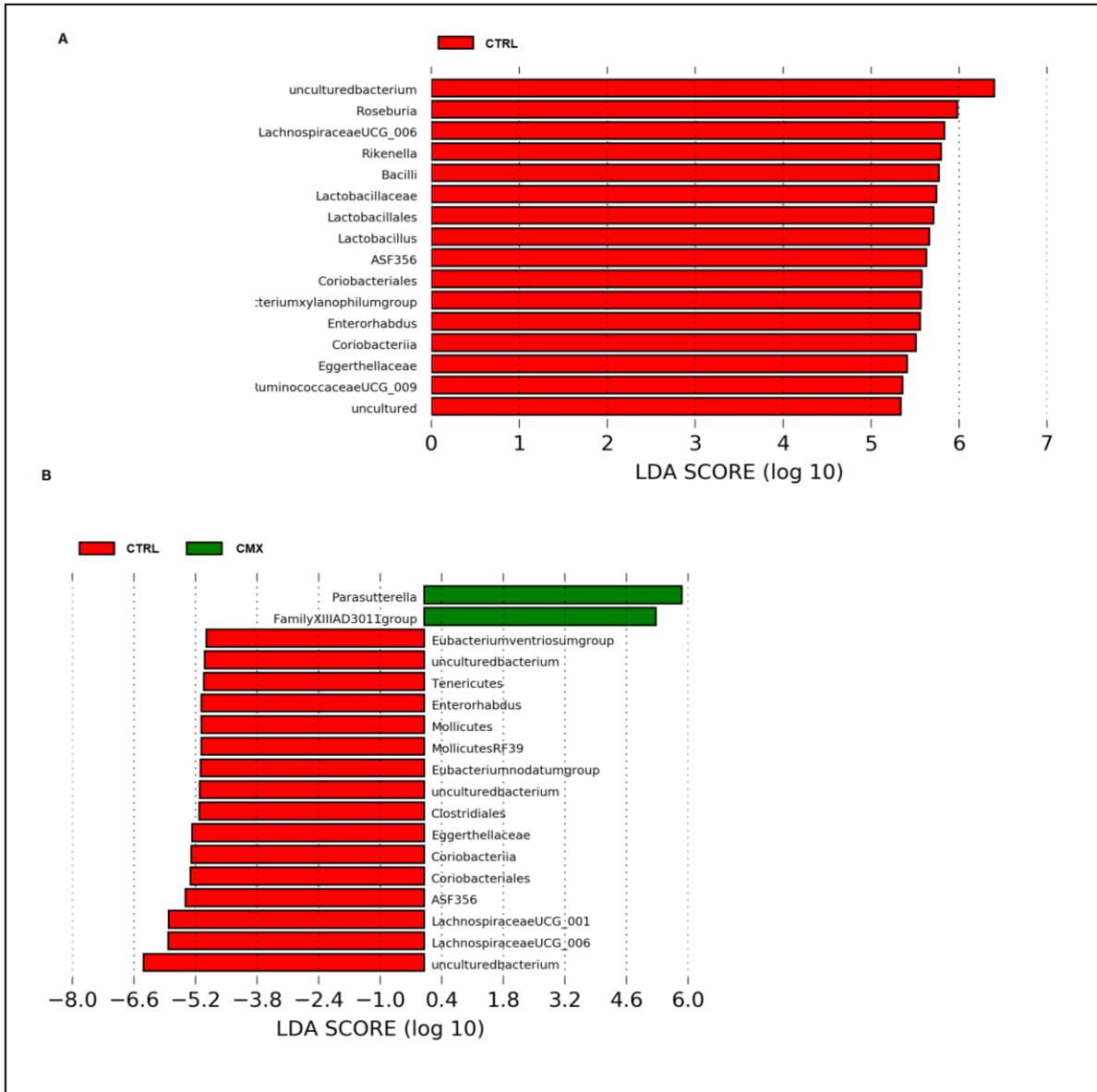
Riqueza, diversidade e abundância de OTUs identificadas pelo sequenciamento por síntese em amostras de animais machos, após a recuperação (#3), dos grupos CTRL (n=3), DES (n=3), CMX (n=3), DES + CMX (n=3). **(A)** Diagrama de caixa representando medidas de diversidade alfa (Observed, Chao1, Shannon, Simpson). **(B)** Análise de Coordenadas Principais dos índices de diversidade de Bray-Curtis.

Figura 25. A relação Bacteroidetes/Firmicutes continua alterada na microbiota intestinal dos animais desnutridos e/ou tratados com Cotrimoxazol mesmo após a recuperação nutricional



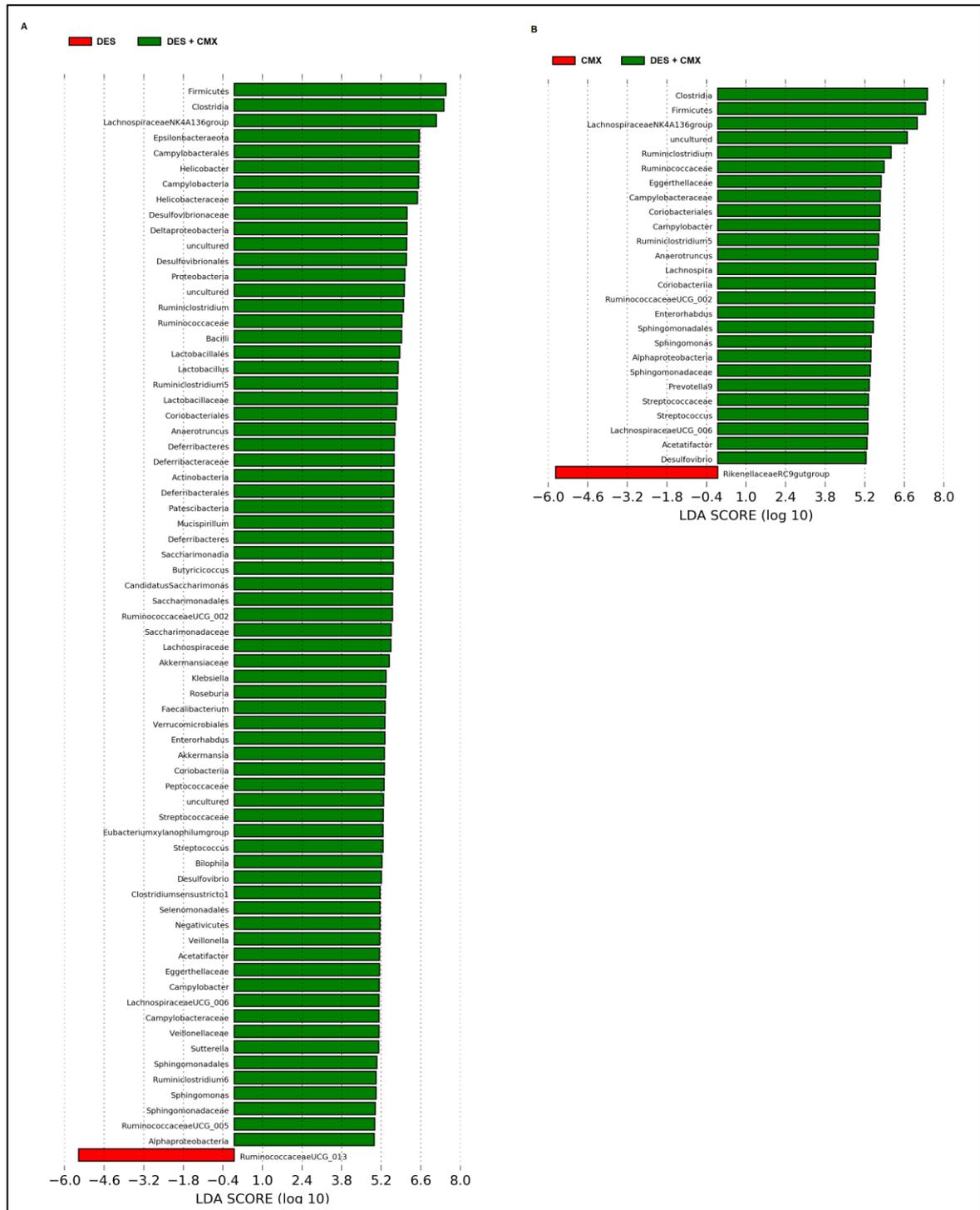
Abundância Relativa de filós nas amostras de animais machos após a recuperação nutricional (#3) dos grupos CTRL (n=3), DES (n=3), CMX (n=3), DES + CMX (n=3)

Figura 26. A disbiose causada pela desnutrição e pelo uso de Cotrimoxazol é mantida após o protocolo de recuperação



Análise discriminante linear e ordenados por tamanho de efeito utilizando o método LEfSe demonstrando o aumento significativo de táxons em escala logarítmica. Táxons de bactérias aumentados em amostras de machos CTRL (n=3), CMX (n=3), DES (n=3) no tempo experimental #3. Comparação entre grupos: (A) Controle e Desnutrição, (B) Controle e Cotrimoxazol.

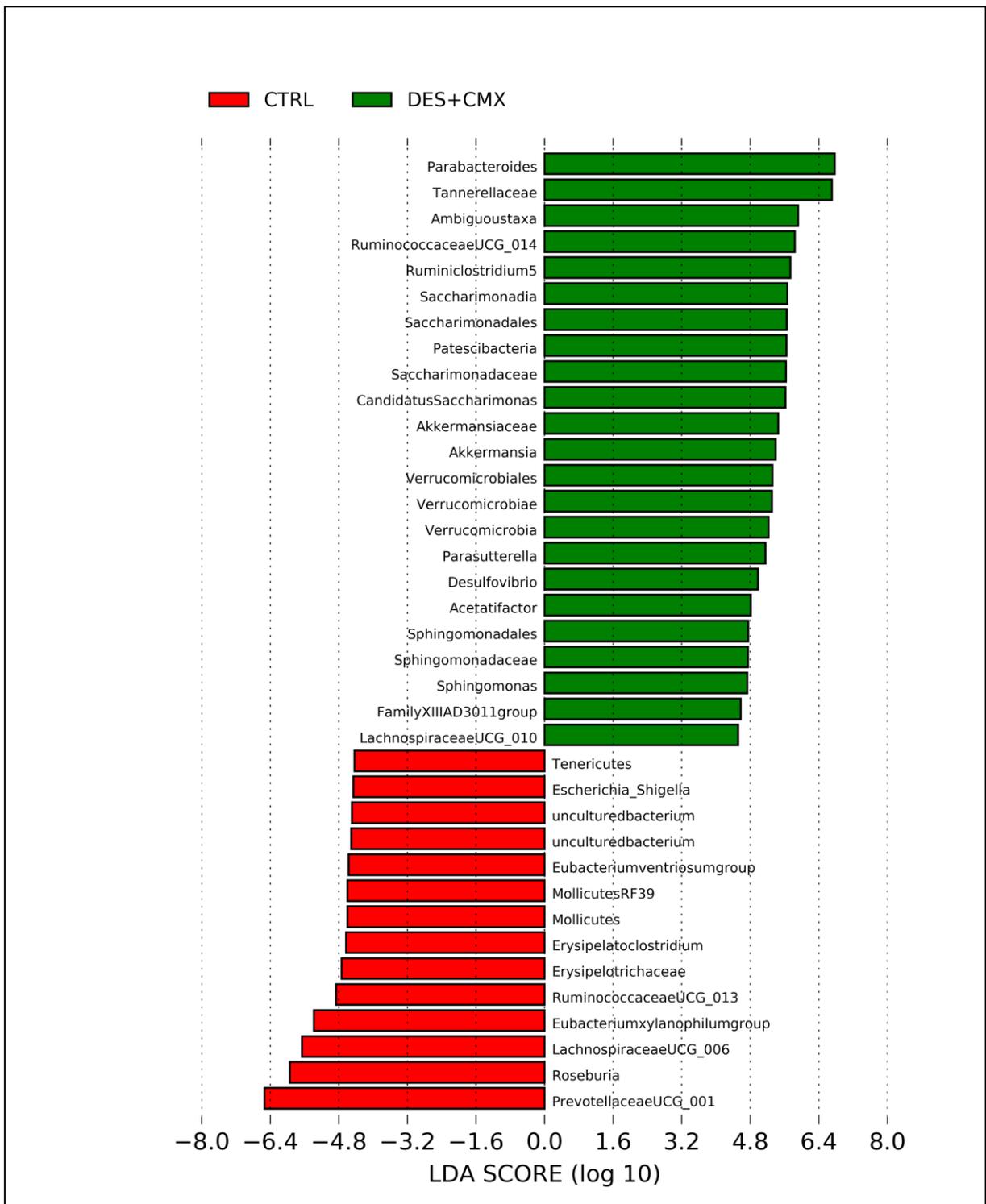
Figura 27. O uso do antimicrobiano no quadro de desnutrição resulta no aumento de diversos grupos de bactérias na microbiota intestinal



Análise discriminante linear e ordenados por tamanho de efeito utilizando o método LEfSe demonstrando o aumento significativo de táxons em escala logarítmica. Táxons de bactérias aumentados em amostras de machos DES (n=3), CMX (n=3), DES + CMX (n=3) no tempo experimental #3. Comparação entre grupos: (A) Desnutrido e Desnutrido + Cotrimoxazol, (B) Cotrimoxazol e Desnutrido + Cotrimoxazol.

Considerando os resultados de aumento de um número expressivo de OTUs nos animais que passaram pelo protocolo de desnutrição e receberam tratamento com antimicrobiano, foi realizada uma análise de comparação direta entre a composição da microbiota desse grupo de animais com os do grupo controle, para conhecer se o aumento dessas OTUs poderia resultar na normalização da microbiota comensal dos animais do grupo DES + CMX. Os animais com duplo tratamento, DES + CMX, apresentam o aumento de 23 grupos bacterianos em relação ao controle e diminuição de 14 grupos (Fig. 28), pelo que o tratamento do antimicrobiano nos animais desnutridos não resulta na normalização da microbiota intestinal, mesmo após a recuperação nutricional.

Figura 28. A microbiota intestinal não é normalizada após os animais desnutridos serem tratados com Cotrimoxazol



Análise discriminante linear e ordenados por tamanho de efeito utilizando o método LEfSe demonstrando o aumento significativo de táxons em escala logarítmica. Táxons de bactérias aumentados em amostras de machos CTRL (n=3), DES + CMX (n=3) no tempo experimental #3. Comparação entre grupos: Controle e Desnutrido + Cotrimoxazol.

4 DISCUSSÃO

Nesse trabalho, buscou-se estabelecer o modelo de desnutrição em camundongos C57BL/6 ainda na infância. Espera-se que recriando o fenótipo de desnutrição infantil nos animais, através da restrição da alimentação, o fenômeno possa ser melhor estudado, sem a implicação de envolver sujeitos humanos que naturalmente se encontram fragilizados. Atualmente, o protocolo preconizado pela OMS para desnutrição é o tratamento com Cotrimoxazol. Porém, o impacto desse, bem como a persistência desse impacto no quadro de desnutrição infantil não havia ainda sido explorado. Por meio do modelo aqui apresentado, pudemos investigar a microbiota dos animais durante a desnutrição, após a recuperação e com presença ou ausência do tratamento. E, dessa forma, entender melhor as possíveis sequelas da desnutrição e do tratamento com antimicrobiano.

Os camundongos C57BL/6 apresentam dimorfismo sexual de tamanho. Machos são maiores, e, portanto, consomem mais ração do que as fêmeas (Fig. 2). O fenômeno já é bem conhecido e descrito nas fichas técnicas dos laboratórios que comercializam a linhagem (The Jackson Laboratory). Machos adultos podem pesar até 5g a mais do que as fêmeas. Por essa razão, o protocolo de desnutrição foi padronizado a partir das curvas de consumo de ração e ganho de peso de cada um dos sexos. Portanto, durante a realização do protocolo os machos receberam um volume maior de ração (1,70 g/dia/animal) em relação às fêmeas (1,46 g/dia/animal).

O protocolo de desnutrição é aplicado da 3^a à 6^a semana de vida do indivíduo. Esse é também o período em que os animais controle apresentam maior ascensão na curva de ganho de peso (Fig. 3). Ou seja, é um período em que os animais ainda estão em crescimento, não sendo considerados adultos, atingindo a maturidade sexual somente a partir da sétima semana de vida (KEMPERMANN; KUHN; GAGE, 1997). Dessa forma, o protocolo de desnutrição é aplicado durante um importante momento para o desenvolvimento do indivíduo, assim como ocorre na desnutrição infantil.

O final do protocolo de desnutrição é o momento de maior diferença de peso entre os grupos de alimentação *ad libitum* e os grupos desnutridos. Para os machos esse déficit de peso foi de 44%, enquanto para as fêmeas foi de 35%. Esses valores

se aproximam ao encontrado por Mittal e Woodward (1985) que desenvolveram um modelo de desnutrição severa em camundongos para o estudo das células epiteliais do timo e que serviu de base para o desenvolvimento do nosso modelo. Também foi definida como severa a desnutrição criada no modelo de Cortés-Barberena et al. (2008), em que os camundongos com apenas 1 dia de vida tiveram sua alimentação restrita pelo número de mamas disponíveis para os filhotes, e apresentaram déficit de peso superior ou igual a 40%. Segundo dados globais levantados pela OMS, uma menina de 5 anos de idade deveria pesar, em média, 17.5 kg (WHO, 2020a). Com um déficit de 40%, ela passaria a pesar 10.5 kg. Esse valor representa o z-escore de 3. Portanto, essa criança estaria sobrevivendo à uma forma aguda e severa de desnutrição, similar ao que observamos em nosso modelo animal.

O período em que ocorre a desnutrição, é o momento onde os animais controle apresentam a maior média de ganho de peso diário (Fig. 5). Em contrapartida, os animais desnutridos não conseguem ganhar peso. Porém, após essas três semanas de desnutrição, é iniciado o protocolo de recuperação. E a relação de ganho de peso diário é invertida, os animais anteriormente desnutridos passam a ter uma média de ganho de peso diário superior ao controle. Portanto, mais que proporcionar um ganho de peso, o protocolo de recuperação foi capaz de retornar o IMC dos animais ao mesmo valor observados nos camundongos com ração *ad libitum* (Fig. 4). O uso de Cotrimoxazol não apresentou efeito no ganho de massa dos animais, estando associado a desnutrição ou não.

Além da massa, a desnutrição também impactou o tamanho dos indivíduos. Machos e fêmeas após o protocolo de desnutrição apresentaram comprimento inferior à sua contrapartida com ração *ad libitum* (Fig. 6 e 8). Essa característica, tamanho inferior a idade, é observada na desnutrição infantil crônica. Porém, o protocolo de recuperação normalizou o comprimento dos animais, que não apresentaram déficit de crescimento na vida adulta.

Interessantemente, a desnutrição também alterou o comprimento do intestino grosso nos animais machos (Fig. 6C e D). O intestino grosso em camundongos é relativamente maior que em humanos, e tem também maior funcionalidade, visto que é rico em microorganismos responsáveis pela fermentação do seu conteúdo, função que em humanos é majoritariamente executada no intestino delgado

(HUGENHOLTZ; VOS, 2017). Os machos DES + CMX apresentaram o menor comprimento para os dois intestinos, porém o mesmo efeito não foi observado nas fêmeas (Fig. 8C e D), sugerindo a necessidade de ampliação do número amostral para melhor compreensão do fenômeno. Outros trabalhos também não observaram alteração do comprimento do intestino após tratamento com antimicrobiano (GRASA *et al.*, 2015; SUÁREZ-ZAMORANO *et al.*, 2015; GE *et al.*, 2017). Entretanto, camundongos GF apresentam maior comprimento do intestino, sugerindo que exista algum ponto no desenvolvimento do animal, ou na diversidade de microorganismo que o colonizam, que é capaz de alterar a formação do órgão como um todo.

O impacto da microbiota no desenvolvimento, vai além dos órgãos em que ela está diretamente relacionada. De fato, camundongos GF também apresentam fígado, coração, rim e baço menores do que a sua contrapartida colonizada (SCHWARZE *et al.*, 2016). Quando esses mesmos animais são inoculados com uma única espécie de bactéria, *Lactobacillus plantarum*, o fenótipo de tamanho dos órgãos é recuperado (SCHWARZE *et al.*, 2016). Baços menores também foram observados em tratamentos com antimicrobiano (OCHOA-REPÁRAZ *et al.*, 2009; REIKVAM *et al.*, 2011; YOSHIYA *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2015; JOSEFSDOTTIR *et al.*, 2017; THACKRAY *et al.*, 2018). Porém, o tratamento com Cotrimoxazol nesse trabalho foi insuficiente para gerar esse fenótipo (Fig. 6E e 8E). Provavelmente devido a redundância de funções que a microbiota apresenta, seria necessário a depleção de um maior número de espécies para que a diminuição desses órgãos fosse observada. A desnutrição, por sua vez, foi capaz de reduzir o peso do baço para machos e fêmeas (Fig. 7A e 9A), mostrando-se como um protocolo bastante agressivo. Esse efeito, de redução do baço, também foi observado em outros modelos de desnutrição. Uma dieta hipoproteica, com somente 0.1% de proteína, reduziu o número de células mononucleares no baço de camundongos BALB/c em apenas 4 dias (MANHART *et al.*, 2000).

Crianças desnutridas apresentam parâmetros bioquímicos séricos, como albumina e proteínas totais, diminuídos (BARTZ *et al.*, 2014). De forma geral, albumina sérica é utilizada para mensurar o status nutricional, enquanto globulina sérica reflete a severidade da inflamação crônica (WU *et al.*, 2019). Porém, identificamos somente a redução das globulinas no nosso modelo, e, por

consequência, das proteínas totais (Fig. 10C). Essa redução pode impactar negativamente a quantidade de imunoglobulinas, como já identificado por outros trabalhos com restrição protéica (AMARAL *et al.*, 2006). A redução de células secretoras de anticorpos foi observada em modelo de desnutrição de porcos, após o desafio imunológico feito com vírus atenuado da vacina humana para rotavírus, no sangue e no intestino (MICHAEL *et al.*, 2020). Já a redução do colesterol total que é relacionada à mortalidade em diversas patologias, não apresenta um perfil clássico na desnutrição (KELLER, 2019). De fato, no nosso modelo não foi observada a redução no colesterol total sérico (Fig 10B).

O sangue, como tecido, apresenta uma grande renovação. As células que o compõe tem uma vida útil curta (OGAWA, 1993). Essa renovação depende de diversos fatores, desde o estado nutricional do indivíduo até níveis inflamatórios (SANTOS *et al.*, 2017). A contagem diferencial de leucócitos no sangue, apresenta suas limitações, porém pode ser utilizada de forma muito ampla em diversos ambientes de pesquisa. Entretanto, utilizando essa metodologia, o modelo não apresentou leucopenia (Fig. 11), sintoma comum em quadros de desnutrição (LEANDRO-MERHI *et al.*, 2017; NÁJERA *et al.*, 2002; SAVINO, 2002). Também não houve diferença nos outros tipos celulares mensurados, seja na desnutrição ou após a recuperação. Porém, o número de células não garante a normal funcionalidade do organismo. Por exemplo, monócitos e macrófagos de camundongos submetidos à uma dieta hipoproteica se apresentaram em normal quantidade, porém essas células expressaram mais arginase *in vitro* e *in vivo*, e, dessa forma aumentaram a susceptibilidade do indivíduo a patógenos (CORWARE *et al.*, 2014).

Em suma, podemos afirmar que o protocolo de desnutrição resulta em animais com fenótipo de desnutrição aguda durante um período crucial para o desenvolvimento. Ao final do protocolo, os animais desnutridos se encontram com metade do peso dos animais controle e também tamanho reduzido. A recuperação alimentar foi capaz de recuperar esse fenótipo morfométrico, normalizando o tamanho dos animais que passaram por desnutrição. O tratamento com Cotrimoxazol não interferiu nem promoveu excesso no ganho de peso. Ao contrário do que é observado na criação de animais de corte, onde o uso de antimicrobianos é feito de forma rotineira para, entre outros efeitos, promover o ganho de peso mais

acelerado nesses animais (BROOM, 2017).

O sequenciamento por síntese permitiu ir além da morfometria para caracterizar o modelo aqui proposto na perspectiva da composição da microbiota. Através do sequenciamento do gene *16S rRNA* extraído de fezes, foi possível identificar mudanças na microbiota conforme o tratamento dos grupos experimentais. Para confirmar que o esforço amostral foi o mesmo para todas as amostras, retirando um possível viés, foi utilizada a curva de rarefação. A curva de rarefação mostra a profundidade em que as amostras foram sequenciadas, onde o eixo y é o número de espécies encontradas enquanto o x representa o esforço de sequenciamento. Atingir um platô no número de espécies identificadas significa que independente do número de sequenciamentos realizados posteriormente, não será identificada mais nenhuma espécie nova (HUGHES *et al.*, 2001). Todas as amostras aqui apresentadas atingiram esse platô (Fig. 12). Portanto, o sequenciamento realizado é representativo de virtualmente todos os organismos portadores do gene *16S rRNA* que foram extraídos com sucesso das amostras de fezes dos animais.

Assim como observado pela morfometria, que o animal ainda está em desenvolvimento no tempo experimental #1, a composição da microbiota também não está totalmente madura quando é iniciado o protocolo de desnutrição. Primeiramente, apenas os animais controle foram analisados quanto à sua microbiota, comparando a sua composição em relação aos tempos experimentais (Fig. 13). Através dos índices de diversidade alfa, foi possível quantificar a riqueza de espécies nas amostras. Os índices Observed e Chao1, que apontam a riqueza de OTUs totais, tiveram sua menor média no tempo experimental #1, sendo esse o menos rico. Essa média cresceu ao longo do tempo, atingindo seu pico no último tempo experimental (#3) ($p=0.0078$) (Fig 13A). Dessa forma, o tempo experimental #3 é o mais rico em número de espécies em comparação aos outros dois. A diferença só ocorre nos índices que observam o número total de espécies. Índices como Shannon e Simpson, que atribuem peso a equidade da representação das espécies (HILL *et al.*, 2003) não apresentaram diferença significativa entre os tempos experimentais.

Essa hipótese, da microbiota ainda não madura no início do protocolo de desnutrição, é reforçada pelo índice de diversidade beta. A diversidade beta pondera

não só a riqueza dentro da amostra, mas também a diversidade de uma amostra em relação à outra, considerando o número e equidade de espécies. O índice de diversidade de Bray-Curtis, utilizado para calcular a diversidade beta, aponta o tempo experimental #2 como um perfil de transição entre o tempo #1 e #3 (Fig. 13B).

Apesar disso, a abundância relativa dos filos é mantida com uma prevalência de Bacteroidetes e Firmicutes durante todos os tempos experimentais (Fig. 14), como já observado em diversos trabalhos esses dois filos predominam em camundongos C57BL/6 (PARKER *et al.*, 2018; SON *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2018). Essa predominância também ocorre em humanos, onde esses filos chegam a representar 90% da abundância da microbiota intestinal (ARUMUGAM *et al.*, 2011; SEGATA *et al.*, 2012), seguidos pelos filos Actinobactérias e Proteobactéria que somam os outros 10% restantes (ARUMUGAM *et al.*, 2011; SEGATA *et al.*, 2012).

O amadurecimento da microbiota dos animais aumenta a quantidade de representantes de todos esses quatro filos (Fig. 15). As Prevotellaceae, família dentro de Bacteroidetes, foi a família com maior aumento no tempo experimental #3 em relação a todos os outros dois tempos, seguida de Ruminococcaceae, uma família de Firmicutes. Em terceiro lugar, Enterobacteriaceae, uma ordem de Proteobacteria, onde também está contido o gênero *Klebsiella* sp. E o filo Actinobactéria também aparece entre as bactérias aumentadas.

Houve um aumento de um quinto grupo, Saccharibacteria, que faz parte de uma proposta recente de um filo denominado Filo Candidato de Radiação, do inglês *candidate phyla radiation* (CPR) (BROWN *et al.*, 2015b). Esse filo é caracterizado por conter organismos com pequenos genomas. Esses genomas reduzidos acarretam em dificuldade de cultivo, já que o crescimento do organismo é dependente de condições muito específicas que são fornecidas pelo seu meio. Dessa forma, é um grupo recente, que só pôde ser descrito a partir do advento da metagenômica, embora acredita-se que o grupo represente cerca de 15% de todo domínio bactéria. A metagenômica modificou nossa compreensão filogenética e possibilitou a formação de uma nova árvore da vida (CASTELLE; BANFIELD, 2018). Estudos que apresentem essas bactérias fazendo parte da microbiota intestinal são bastante recentes (YIMAGOU *et al.*, 2020). Nos animais de tempo experimental #3 foi identificado o aumento dos táxons: gênero *CandidatusSaccharimonas* sp., família

Saccharimonadacea, ordem Saccharimonadales e classe Saccharimonadia.

Após a análise da microbiota dos indivíduos controle em relação ao tempo, foi feita a análise do tempo experimental #2, onde ocorreu a primeira perturbação da microbiota. Esse é o momento onde o protocolo com Cotrimoxazol e o protocolo de desnutrição foram finalizados. No entanto, essa perturbação não foi observada através da diversidade alfa que não foi menor nos grupos que passam por algum desses protocolos, sejam os animais machos (Fig. 16A) ou fêmeas (Fig. 20A). Em crianças HIV soro positivas que fizeram o uso profilático de Cotrimoxazol, também não foi observado diminuição da diversidade alfa. Porém, quando esses indivíduos têm sua microbiota analisada quanto aos genes de resistência, percebe-se um aumento da diversidade alfa para os genes de resistência (D'SOUZA *et al.*, 2019). A perturbação ficou mais evidente através da diversidade beta, modificada a partir do uso de antimicrobiano. O grupo tratado com Cotrimoxazol gerou amostras mais semelhantes entre si, independente do status nutricional, mostrando que, na modulação da microbiota, o antimicrobiano atua mais que a desnutrição (Fig. 16B e 20B). A abundância relativa é também mais perturbada devido ao uso de antimicrobiano (Fig. 17 e 21). Os camundongos tratados somente com Cotrimoxazol apresentaram aumento na relação Bacteroidetes/Firmicutes. O mesmo resultado, a expansão de Bacteroidetes e redução de Firmicutes, foi observado em humanos adultos atendidos em hospital por motivos de doenças não digestiva (bronquites, infecção do trato urinário, pneumonia ou bacterímia) e tratados com antimicrobianos das classes Fluroquinolonas e β -lactâmicos. Esses indivíduos tiveram sua microbiota sequenciada a partir de fezes doadas antes e depois do tratamento, que teve duração de sete dias (PANDA *et al.*, 2014).

O efeito do uso de Cotrimoxazol fica mais evidente na análise por LEfSe (Fig. 18), onde mais de 31 OTUs foram diminuídas em relação ao controle, enquanto que para a desnutrição, esse número foi somente de 16 OTUs. Entretanto, os dois tratamentos ocasionaram a perda de Ruminococcaceae, uma família dentro de Firmicutes. Esta família teve um dos primeiros organismos a serem identificados compondo a microbiota humana (RAJILIĆ-STOJANOVIĆ; VOS, 2014). A perda de diversidade de Ruminococcaceae está relacionada com dietas de baixo teor em fibras, e por consequência, maior ganho de peso dos animais (MENNI *et al.*, 2017).

Além disso, espécies de *Ruminococcus* sp. já foram identificadas em bebês recém nascidos, fazendo parte da microbiota humana desde muito cedo (MORELLI, 2008). O gênero tem um papel importante na proteção do hospedeiro, pois produz bacteriocina A, uma toxina proteínica capaz de inibir o crescimento *in vitro* de diversos patógenos da classe Clostridia, inclusive *Clostridioides difficile* (DABARD *et al.*, 2001), agente causador da colite pseudomembranosa. *Lactococcus* sp. e Streptococcaceae também são perdidos nos dois protocolos (desnutrição e Cotrimoxazol), sendo também pertencentes ao filo Firmicutes.

A perda de firmicutes e consequente aumento na relação Bacteroidetes/Firmicutes é classicamente observada na disbiose presente em quadros de obesidade (HILDEBRANDT *et al.*, 2009; LEY *et al.*, 2006; WIT *et al.*, 2012). Em camundongos que tem o gene *ob* deletado, e portanto não tem atuação da proteína leptina que atua como um fator de saciedade, foi observado o mesmo aumento na relação Bacteroidetes/Firmicutes (BACKHED *et al.*, 2004). Nesse trabalho, a análise metagenômica revelou o aumento da expressão de genes presentes nessa microbiota que são importantes para síntese do ácidos graxos de cadeia curta que podem ser utilizados na lipogênese hepática. Dessa forma, essa alteração do microbioma associada com obesidade poderia ter maior capacidade de absorver e metabolizar calorias da dieta. Tal observação poderia explicar, pelo menos em parte, o ganho de peso de pessoas e outros animais, tratados com antibiótico para esse fim, como também o porquê indivíduos recuperados de desnutrição apresentam tendências à obesidade (WHO, 2017). Sobreviventes da “grande fome” causada pela Segunda Guerra Mundial têm sido extensivamente estudados em diferentes contextos. Ravelli *et al.* (1976) mostrou a prevalência de obesidade em homens de 19 anos, cujas mães tiveram desnutrição durante o início da gestação, superior em relação ao resto da população. Um levantamento realizado em uma região carente de Maceió mostrou que a prevalência de crianças com alguma forma de desnutrição na região era de 20.8%. No mesmo contexto, 13% dos adolescentes apresentavam IMC elevado e 11% tinham estatura inferior a idade devido à desnutrição. Os adultos, por sua vez, apresentavam quadro de obesidade (25%), mas também estatura diminuída (22%). Por fim, obesidade e desnutrição coexistiam em 30% das famílias. O estudo conclui que a obesidade é uma possível

consequência da desnutrição infantil (FLORÊNCIO *et al.*, 2001).

O gênero *Rikenellaceae RC9 gut group*, aumentado em camundongos tratados com Cotrimoxazol, apresenta pouca descrição na literatura pois sua existência só foi evidenciada recentemente através da metagenômica. Porém, em um modelo de doença arterial coronariana desenvolvido em ratos, foi observado que mudanças na microbiota contribuíram com a patogênese devido ao aumento da permeabilidade do intestino. Essa mudança da microbiota consistia no aumento de quatro gêneros, entre eles, *Rikenellaceae RC9 gut group* (SUN *et al.*, 2019). Dessa forma, é possível que os animais tratados com Cotrimoxazol tenham sua permeabilidade intestinal aumentada, o que possibilitaria a formação de quadros inflamatórios no intestino. Por sua vez, os animais que passaram pela desnutrição tiveram o aumento de *Ruminococcaceae UCG-013*. Esse gênero também é pouco descrito na literatura e, até agora, nenhum trabalho descreveu seu aumento vinculado à desnutrição.

As diferenças fisiológicas dos sexos decorrem pelos hormônios que cada um deles produz em maior quantidade. A sinalização hormonal se dá de forma sistêmica, e por isso, diferenças entre os sexos são observadas por todo o organismo, incluindo a composição da microbiota de animais da mesma espécie (KIM *et al.*, 2020). Dessa forma, tratamentos com antimicrobiano têm impactos diferente na microbiota de machos e de fêmeas (VEMURI *et al.*, 2018). Essas diferenças podem ser tão grandes a ponto de influenciar o comportamento dos indivíduos. Fêmeas de hamster tratadas com Enrofloxacin, antimicrobiano de amplo espectro, apresentaram níveis reduzidos de agressividade. O mesmo fenótipo só foi observado em machos quando esses passaram pelo tratamento por uma segunda vez (SYLVIA *et al.*, 2017).

É observada a diferença entre os sexos também nesse trabalho. Fêmeas, diferentemente dos machos, apresentaram um aumento de espécies em relação ao controle após tanto à desnutrição quanto o tratamento com Cotrimoxazol (Fig. 22). Para o grupo desnutrido, 21 OTUs foram aumentadas e o gênero *Ruminococcaceae UCG-014* foi o que apresentou maior aumento. Ele está contido na mesma família do gênero aumentado nos machos desnutridos. As fêmeas ainda apresentaram aumento do gênero *Ruminococcaceae UCG-005*. A família Ruminococcaceae vêm

sendo vinculada a fenótipos de emagrecimento (MENNI *et al.*, 2017). Em uma dieta indutora de obesidade, camundongos expostos a baixas temperaturas apresentaram uma mudança na microbiota intestinal ligada com aumento de atividade metabólica. O aumento de 4 táxons, entre eles a família Ruminococcaceae, e a diminuição de outros três foi relacionado com a mudança que impediu o ganho de peso dos animais (ZlęTAK *et al.*, 2016). Dessa forma, podemos inferir que modulações no número de *Ruminococcaceae sp.* estejam atreladas com adaptações metabólicas causadas por condições energéticas, no caso do nosso trabalho, ao déficit calórico. Houve também a diminuição de representantes da família Sphingomonadaceae nas fêmeas desnutridas. Essa família apresenta baixa frequência na composição da microbiota humana, porém parece fazer parte do núcleo base da microbiota da nossa espécie, ou seja, táxons cuja a presença é necessária para caracterização de uma microbiota saudável (D'AURIA *et al.*, 2013).

As fêmeas tratadas com Cotrimoxazol apresentaram somente aumento de táxons em relação ao controle, nenhuma diminuição. Um resultado que precisa ser confirmado e melhor explorado em trabalhos futuros, visto que o antimicrobiano deveria atuar sobre algumas espécies ocasionando a diminuição de táxons. A expansão de algumas bactérias pode ocorrer devido ao uso do fármaco, como observado para os machos. O fenômeno ocorre pela relação ecológica que existe entre os indivíduos que compõem a microbiota. Ou seja, após a atuação do antimicrobiano, e a conseqüente diminuição de indivíduos, cria-se nichos vazios que serão ocupados por outros indivíduos não afetados pelo fármaco, ocasionando a expansão desses. Porém, isso não explica o perfil das fêmeas após a desnutrição, onde o uso de antimicrobiano somente aumentou e não diminuiu nenhum grupo de bactérias (Fig. 22). Ainda assim, a expansão de Bacteroidetes, efeito que foi descrito para os machos desnutridos, também foi observada para as fêmeas.

Os animais que foram submetidos aos dois protocolos simultaneamente (Cotrimoxazol e desnutrição) apresentam maior aumento do número de espécies em relação aos animais que passaram por um único protocolo, efeito observado em machos (Fig. 19) e fêmeas (Fig. 23). Esse aumento do número de espécies não necessariamente significa um quadro mais saudável. De fato, entre os grupos aumentados para os machos DES + CMX em relação ao grupo DES, temos gênero

Helicobacter sp., que tem como famoso representante a espécie *H. pylori* cuja infecção é a causa principal para gastrite crônica e úlcera péptica na mucosa gástrica (BLASER, 1999; CAMILO *et al.*, 2017). Outro gênero aumentado é *Bilophila* sp. Uma espécie desse gênero, *B. wadsworthia*, tem seu aumento associado com dietas ricas em gorduras em humanos (DAVID *et al.*, 2013). E em camundongos atua de forma sinérgica com dieta hipercalórica promovendo maior quadro de inflamação intestinal e alterações no metabolismo do ácido biliar que ocasionaram esteatose hepática (NATIVIDAD *et al.*, 2018). Entretanto, quando comparamos o grupo DES + CMX com CMX há um aumento do filo Firmicutes. Isso também foi observado na abundância relativa dos filós (Fig. 17). Esse aumento de Firmicutes restaura a relação Bacteroidetes/Firmicutes que é alterada quando os protocolos de desnutrição e Cotrimoxazol são aplicados individualmente.

As fêmeas com duplo tratamento (Cotrimoxazol e desnutrição) também apresentaram um aumento do número de espécies em relação aos grupos de tratamento único (Fig. 23). Em relação às fêmeas desnutridas, as de duplo tratamento tiveram aumento da classe Clostridia, e, dentro dela, mais especificamente, da família Ruminococcaceae. Já em relação as fêmeas tratadas com Cotrimoxazol, houve o aumento dos dois filós, Bacteroidetes e Actinobacteria. Curiosamente, o gênero *Blautia* esteve aumentado nas fêmeas DES + CMX em relação tanto ao grupo DES quanto CMX. Em um trabalho com humanos adultos esse foi o único gênero de bactéria que teve alguma correlação com acúmulo de gordura visceral. Quanto maior a quantidade de representantes do gênero, menor o acúmulo de gordura, independente do sexo dos indivíduos (OZATO *et al.*, 2019). Em um outro estudo, a microbiota de crianças obesas foi comparada com a de crianças não-obesas. As crianças obesas apresentavam redução de *Blautia* sp., e essa redução era maior caso a criança também tivesse resistência à insulina. Nesse mesmo trabalho, foi proposto que a redução de *Blautia* sp. se relaciona com o aumento de marcadores pró-inflamatórios, o que levaria a um agravamento do fenótipo da obesidade, através de observações *in vivo* e *in vitro* (BENÍTEZ-PÁEZ *et al.*, 2020). Dessa forma, o aumento de *Blautia* sp. no grupo DES + CMX pode ser visto como recuperação da disbiose causada pelos dois protocolos quando esses são aplicados de forma independente.

As duas semanas de recuperação que garantiram a normalização do peso dos animais, mas não normalizaram a composição da microbiota, tanto para animais que se recuperaram da desnutrição, quanto para os que cessaram o uso de antimicrobiano (Fig. 26). Os primeiros, tiveram a redução de 16 OTUs em relação ao controle. É o mesmo número de OTUs observadas previamente a recuperação, porém não são todos os mesmos táxons. Uma das diminuições não observadas anteriormente é a de *Lactobacillus sp.*, gênero vinculado com o crescimento normal do indivíduo (SCHWARZE *et al.*, 2016). Apesar dos camundongos terem normalizado seu tamanho, a redução de *Lactobacillus sp.* observada no modelo aqui proposto pode ser um dos fatores responsáveis pela estatura reduzida em crianças recuperadas da desnutrição infantil. Membros da família Rikenellaceae estão ausentes em crianças com Kwashiorkor, no nosso modelo, o gênero *Rikenella sp.* estava diminuído em animais recuperados de desnutrição (ALOU *et al.*, 2017).

Já os animais após duas semanas cessado o uso de Cotrimoxazol apresentaram uma diminuição de OTUs em relação ao período de uso do fármaco, de 31 para 16. Apesar da recuperação de alguns táxons, a família Lachnospiraceae e a ordem Clostridiales continuaram. A ordem, da qual o patógeno *Clostridioides difficile* faz parte, é também representada por diversos organismos comensais. Esses comensais exercem papel importante na fermentação de alimentos e produção de butirato (PRYDE *et al.*, 2002), um ácido graxo de cadeia curta utilizado como fonte de energia pelos colonócitos (CLAUSEN; MORTENSEN, 1995).

A comparação do grupo duplo tratado (DES + CMX) com os grupos que passaram somente por um tratamento após a recuperação é a análise que mostrou maior diferença de táxons observada nesse trabalho (Fig. 27). Após as duas semanas de recuperação, as diferenças entre DES e DES + CMX se amplificaram passando de 22 táxons aumentados, no tempo experimental #2, para 69, no tempo experimental #3. O aumento ocorreu em três filos: Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria. A comparação com CMX também apresentou aumento, passando de 15 para 26 táxons. Mesmo com diferente efeito, os dois tiveram aumento do filo Firmicutes, em específico da ordem Clostridia.

Esse resultado sugere uma mitigação do tratamento com Cotrimoxazol no quadro de desnutrição. O uso profilático de Cotrimoxazol já foi avaliado em crianças

HIV soro positivas da Uganda e do Zimbabue. O microbioma delas não foi comparado com o de outras crianças, mas sim entre o grupo que teve o uso profilático continuado e o que teve o uso descontinuado. Não foram identificadas diferenças significativas na microbiota dos grupos, porém marcadores de inflamação sistêmica estavam reduzidos no grupo de uso continuado (BOURKE *et al.*, 2019).

Porém quando a composição da microbiota originada pelo tratamento do antimicrobiano nos animais desnutridos é comparada com o animal controle, percebe-se que o tratamento não resulta na normalização da microbiota intestinal, mesmo após a recuperação nutricional (Fig. 28). Os animais com duplo tratamento, DES + CMX, apresentam o aumento de 23 grupos bacterianos em relação ao controle. Entre os grupos aumentados estão as Saccharimonas, cujo aumento foi anteriormente identificado no amadurecimento da microbiota (Fig. 15). Outro grupo foi *RuminococcaceaeUCG_14*, o aumento desse gênero também foi observado nos animais que passaram somente pela desnutrição. Além dos aumentos, o duplo tratamento também gerou diminuição de grupos em relação ao controle, 14 grupos de bactérias foram diminuídos. O gênero *Prevotella*, que também apresentaram expansão com o amadurecimento da microbiota (Fig. 15), tiveram uma espécie diminuída no duplo tratamento.

O uso de antimicrobiano em crianças traz sequelas na composição da microbiota que perduram para muito além do uso do fármaco (KORPELA *et al.*, 2016). E trabalhos que relacionam a diminuição da mortalidade de crianças desnutridas com o uso profilático de antimicrobianos têm sido questionados por outros trabalhos que demonstram não haver diferença entre os grupos tratados com o placebo (NEL, 2018). Considerando esses achados com os resultados obtidos no presente trabalho, considera-se que o uso do antimicrobiano no tratamento da desnutrição resulta em um outro perfil de microbiota intestinal e não na sua normalização, portanto enquanto o único tratamento for com o uso de antimicrobiano para quadros de desnutrição severa, deve-se considerar terapias posteriores que ajudem no reestabelecimento dessa microbiota.

Em resumo, foi desenvolvido por meio dessa dissertação um modelo animal de desnutrição infantil severa e aguda em camundongos C57BL/6, machos e fêmeas. O modelo, que atua através da restrição alimentar, recriou o fenótipo morfométrico

observado em humanos desnutridos. Os animais, submetidos ao protocolo de desnutrição por três semanas, tiveram déficit de crescimento. O peso e a altura foi significativamente menor do que o normal para sua faixa etária. A globulina sérica também foi reduzida. Além desses, o protocolo impactou no peso do baço dos animais. Portanto, foi possível produzir um fenótipo de desnutrição infantil em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas.

A avaliação da microbiota intestinal mostrou que o modelo aqui proposto é iniciado durante um período em que a microbiota ainda apresenta um perfil de composição juvenil, não estando totalmente madura. Dessa forma, a disbiose ocasionada pelo protocolo de desnutrição é mantida, mesmo após a recuperação nutricional, o que também é observado na desnutrição infantil. Essa disbiose é caracterizada pela diminuição de representantes de todos os filos, sendo os Firmicutes os mais afetados, com marcada alteração na relação Bacteroidetes/Firmicutes. O uso do antimicrobiano no tratamento da desnutrição ocasiona o desenvolvimento de uma disbiose diferente daquela resultante da desnutrição. Portanto, não normaliza a composição da microbiota, de fato gerando um terceiro perfil disbiótico.

As observações aqui apresentadas precisam ser mais exploradas pois as análises feitas consideraram somente os aspectos gerais do perfil da microbiota na cinética experimental aplicada e os tratamentos aplicados aos animais de experimentação. Consideramos que análises funcionais dos diferentes perfis de microbiota apresentados possam proporcionar dados qualitativos das mudanças observadas ao longo do protocolo, entendendo melhor os efeitos da desnutrição e do seu tratamento com antimicrobiano. Além disso, uma determinação do perfil bioquímico dos animais ao longo do protocolo desenvolvido, assim como uma avaliação quanti e qualitativa dos diferentes componentes do sistema imunológico, são metas futuras dessa linha de trabalho.

Finalmente, o modelo aqui apresentado pode ser utilizado para resolver questões tão antigas como o uso profilático ou não de antimicrobiano em quadros de desnutrição infantil. Como também para preposição de novas terapias para a desnutrição, que não somente restaurem o fenótipo morfométrico do indivíduo, mas também se preocupem com a composição da microbiota. Assim, minimizando as

sequelas causadas por essa que é uma das condições mais cruéis que uma criança pode ser submetida.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho reproduziu com sucesso um modelo de desnutrição infantil na linhagem de camundongos C57BL/6 para os dois sexos e, pela primeira vez, caracterizou o impacto desse modelo em parâmetros morfométricos, bioquímicos e impacto na microbiota intestinal.

A caracterização observou a reprodução de vários parâmetros clínicos que são também encontrados na desnutrição infantil humana, como diminuição de tamanho e peso e alterações bioquímicas no soro. Sendo assim, o modelo poderá ser empregado no estudo da desnutrição infantil humana.

Além disso, o modelo permitiu determinar quantitativa e qualitativamente os efeitos na microbiota comensal tanto da desnutrição como no uso do Cotrimoxazol, antimicrobiano preconizado pela OMS no tratamento de crianças desnutridas. O principal achado nesse sentido determinou que esse tratamento não restaura a microbiota comensal mas resulta num outro tipo de disbiose, cujos efeitos subsequentes permanecem desconhecidos.

Como limitações do estudo devem-se mencionar a necessidade de aprofundar a caracterização bioquímica e imunológica do modelo de desnutrição aqui avaliado.

Como perspectiva, considera-se que a análise funcional das mudanças na microbiota em relação à alteração de vias metabólicas quanto da dinâmica do sistema imune, devem fornecer dados importantes sobre as sequelas da desnutrição infantil em longo prazo.

Por último, a aplicação do modelo desenvolvido combinado com outros fatores, como desafios com patógenos ou em animais suscetíveis a doenças autoimunes ou alérgicas, permitiria conhecer as sequelas em longo prazo da desnutrição sofrida na infância sobre outro tipo de patologias sem direta relação com a desnutrição, o que por sua vez contribuiria a conhecer com maior precisão os impactos da desnutrição infantil na população em geral.

REFERÊNCIAS

- A HILL, D; HOFFMANN, C; ABT, M C; DU, Y; KOBULEY, D; KIRN, T J; BUSHMAN, F D; ARTIS, D. Metagenomic analyses reveal antibiotic-induced temporal and spatial changes in intestinal microbiota with associated alterations in immune cell homeostasis. **Mucosal Immunology**, v. 3, n. 2, p. 148-158, 25 nov. 2009.
- A REDDY, Elizabeth; SHAW, Andrea V; A CRUMP, John. Community-acquired bloodstream infections in Africa: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, p. 417-432, jun. 2010.
- ADAMSSON, Inger; NORD, Carl Erik; LUNDQUIST, Per; SJÖSTEDT, Svante; EDLUND, Charlotta. Comparative effects of omeprazole, amoxycillin plus metronidazole versus omeprazole, clarithromycin plus metronidazole on the oral, gastric and intestinal microflora in *Helicobacter pylori*-infected patients. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, n. 5, p. 629-640, nov. 1999.
- ALMEIDA, Rowena; GERBABA, Teklu; PETROF, Elaine O.. Recurrent *Clostridium difficile* infection and the microbiome. **Journal Of Gastroenterology**, v. 51, n. 1, p. 1-10, 8 jul. 2015
- ALOU, Maryam Tidjani; MILLION, Matthieu; TRAORE, Sory I.; MOUELHI, Donia; KHELAIPIA, Saber; BACHAR, Dipankar; CAPUTO, Aurelia; DELERCE, Jeremy; BRAH, Souleymane; ALHOUSSEINI, Daouda. Gut Bacteria Missing in Severe Acute Malnutrition, Can We Identify Potential Probiotics by Culturomics? **Frontiers In Microbiology**, v. 8, 23 maio 2017.
- AMARAL, J.F.; FOSCHETTI, D.A.; ASSIS, F.A.; MENEZES, J.s.; VAZ, N.M.; FARIA, A.M.C.. Immunoglobulin production is impaired in protein-deprived mice and can be restored by dietary protein supplementation. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*, v. 39, n. 12, p. 1581-1586, dez. 2006.
- ANDERSON, Marti J.. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. **Austral Ecology**, v. 26, n. 1, p. 32-46, fev. 2001.
- ANDOH, Akira; TSUJIKAWA, Tomoyuki; FUJIYAMA, Yoshihide. Role of Dietary Fiber and Short-Chain Fatty Acids in the Colon. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 4, p. 347-358, 1 fev. 2003.
- ANSTEAD, Gregory M.; CHANDRASEKAR, Bysani; ZHAO, Weiguo; YANG, Jue; PEREZ, Luis E.; MELBY, Peter C.. Malnutrition Alters the Innate Immune Response and Increases Early Visceralization following *Leishmania donovani* Infection. **Infection And Immunity**, v. 69, n. 8, p. 4709-4718, 1 ago. 2001.
- ARPAIA, Nicholas; CAMPBELL, Clarissa; FAN, Xiyang; DIKIY, Stanislav; VEEKEN, Joris van Der; DEROOS, Paul; LIU, Hui; CROSS, Justin R.; PFEFFER, Klaus; COFFER, Paul J.. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. **Nature**, v. 504, n. 7480, p. 451-455, 13 nov. 2013.
- ARRIETA, Marie-Claire; STIEMSMA, Leah T.; AMENYOGBE, Nelly; BROWN, Eric M.; FINLAY, Brett. The Intestinal Microbiome in Early Life: health and disease. **Frontiers In Immunology**, 5 set. 2014.

ASSA, Ammit; VONG, Linda; PINNELL, Lee J.; AVITZUR, Naama; JOHNSON-HENRY, Katheene C.; SHERMAN, Phillip M.. Vitamin D Deficiency Promotes Epithelial Barrier Dysfunction and Intestinal Inflammation. **Journal Of Infectious Diseases**, v. 210, n. 8, p. 1296-1305, 21 abr. 2014.

ASHLEY, Elizabeth A.; LUBELL, Yoel; WHITE, Nicholas J.; TURNER, Paul. Antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from community acquired infections in Sub-Saharan Africa and Asian low and middle income countries. **Tropical Medicine & International Health**, v. 16, n. 9, p. 1167-1179, 24 jun. 2011.

BABIREKERE-IRISO, Esther; MUSOKE, Philippa; KEKITIINWA, Adeodata. Bacteraemia in severely malnourished children in an HIV-endemic setting. *Annals Of Tropical Paediatrics*, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 319-328, dez. 2006.

BACHOU, Hanifa; TYLLESKÄR, Thorkild; KADDU-MULINDWA, Deogratias H; TUMWINE, James K. Bacteraemia among severely malnourished children infected and uninfected with the human immunodeficiency virus-1 in Kampala, Uganda. *Bmc Infectious Diseases*, v. 6, n. 1, 7 nov. 2006a.

BACHOU, Hanifa; TYLLESKÄR, Thorkild; DOWNING, Robert; TUMWINE, James K. Severe malnutrition with and without HIV-1 infection in hospitalised children in Kampala, Uganda: differences in clinical features, haematological findings and cd4+cell counts. *Nutrition Journal*, v. 5, n. 1, 16 out. 2006b.

BACKHED, F.; DING, H.; WANG, T.; HOOPER, L. V.; KOH, G. Y.; NAGY, A.; SEMENKOVICH, C. F.; GORDON, J. I.. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 101, n. 44, p. 15718-15723, 25 out. 2004.

BAHWERE, Paluku; LEVY, Jack; HENNART, Philippe; DONNEN, Philippe; LOMOYO, Wan'Ango; DRAMAIX-WILMET, Michèle; HEMELOF, Wim; BUTZLER, Jean-Paul; MOL, Patrick de. Community-acquired bacteremia among hospitalized children in rural Central Africa. *International Journal Of Infectious Diseases*, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 180-188, 2001.

BALMER, Maria L.; SCHÜRCH, Christian M.; SAITO, Yasuyuki; GEUKING, Markus B.; LI, Hai; CUENCA, Miguelangel; KOVTONYUK, Larisa V.; MCCOY, Kathy D.; HAPFELMEIER, Siegfried; OCHSENBEIN, Adrian F.. Microbiota-Derived Compounds Drive Steady-State Granulopoiesis via MyD88/TICAM Signaling. **The Journal Of Immunology**, v. 193, n. 10, p. 5273-5283, 10 out. 2014.

BARTZ, Sarah; MODY, Aaloke; HORNIK, Christoph; BAIN, James; MUEHLBAUER, Michael; KIYIMBA, Tonny; KIBONEKA, Elizabeth; STEVENS, Robert; BARTLETT, John; PETER, John V. St. Severe Acute Malnutrition in Childhood: hormonal and metabolic status at presentation, response to treatment, and predictors of mortality. *The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 99, n. 6, p. 2128-2137, 1 jun. 2014

BECATTINI, Simone; TAUR, Ying; PAMER, Eric G.. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. **Trends In Molecular Medicine**, v. 22, n. 6, p. 458-478, jun. 2016.

BELMONTE, Liliana; COËFFIER, Moïse; PESSOT, Florence Le; MIRALLES-BARRACHINA, Olga; HIRON, Martine; LEPLINGARD, Antony; LEMELAND, Jean-François;

HECKETSWEILER, Bernadette; DAVEAU, Maryvonne; DUCROTTÉ, Philippe. Effects of glutamine supplementation on gut barrier, glutathione content and acute phase response in malnourished rats during inflammatory shock. **World Journal Of Gastroenterology**, v. 13, n. 20, p. 2833, 2007.

BELKAID, Yasmine; HAND, Timothy W.. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 121-141, mar. 2014.

BELKAID, Yasmine; HARRISON, Oliver J.. Homeostatic Immunity and the Microbiota. **Immunity**, v. 46, n. 4, p. 562-576, abr. 2017.

BENÍTEZ-PÁEZ, Alfonso; PUGAR, Eva M. Gómez del; LÓPEZ-ALMELA, Inmaculada; MOYA-PÉREZ, Ángela; CODOÑER-FRANCH, Pilar; SANZ, Yolanda. Depletion of *Blautia* Species in the Microbiota of Obese Children Relates to Intestinal Inflammation and Metabolic Phenotype Worsening. **Msystems**, v. 5, n. 2, 24 mar. 2020.

BERKLEY, James A.; NGARI, Moses; THITIRI, Johnstone; MWALEKWA, Laura; TIMBWA, Molline; HAMID, Fauzat; ALI, Rehema; SHANGALA, Jimmy; MTURI, Neema; JONES, Kelsey D J. Daily co-trimoxazole prophylaxis to prevent mortality in children with complicated severe acute malnutrition: a multicentre, double-blind, randomised placebo-controlled trial. *The Lancet Global Health*, [S.L.], v. 4, n. 7, p. 464-473, jul. 2016.

BERNBOM, Nete; NØRRUNG, Birgit; SAADBYE, Peter; MØLBAK, Lars; VOGENSEN, Finn K.; LICHT, Tine Rask. Comparison of methods and animal models commonly used for investigation of fecal microbiota: effects of time, host and gender. **Journal Of Microbiological Methods**, v. 66, n. 1, p. 87-95, jul. 2006.

BLACK, Alex; BRATZLER, John W.. The Effects of a Vitamin B12 Supplement, Vitamin B12 and Streptomycin on the Metabolism of the Rat. **The Journal Of Nutrition**, v. 47, n. 2, p. 159-173, 1 jun. 1952.

BLANTON, L. V.; CHARBONNEAU, M. R.; SALIH, T.; BARRATT, M. J.; VENKATESH, S.; ILKAVEYA, O.; SUBRAMANIAN, S.; MANARY, M. J.; TREHAN, I.; JORGENSEN, J. M.. Gut bacteria that prevent growth impairments transmitted by microbiota from malnourished children. **Science**, v. 351, n. 6275, p. 1-2, 18 fev. 2016

BLASER, Martin J.. Hypothesis: the changing relationships of *helicobacter pylori* and humans. **The Journal Of Infectious Diseases**, v. 179, n. 6, p. 1523-1530, jun. 1999.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 1 ago. 2014.

BOLICK, David T; KOLLING, Glynis L; MOORE, John H; OLIVEIRA, Luís Antônio de; TUNG, Kenneth; PHILIPSON, Casandra; VILADOMIU, Monica; HONTECILLAS, Raquel; BASSAGANYA-RIERA, Josep; GUERRANT, Richard L. Zinc deficiency alters host response and pathogen virulence in a mouse model of enteroaggregative *Escherichia coli*-induced diarrhea. **Gut Microbes**, v. 5, n. 5, p. 618-627, 3 set. 2014.

BOLYEN, E. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852–857, 24 ago. 2019.

BOGNER, Paul N.; KILLEEN, Anthony A.. Extraction of nucleic acids. In: COLEMAN, William B.; TSONGALIS, Gregory J. (ed.). *Molecular diagnostics: for the clinical laboratorian*. New Jersey: Humana Press, 2006. p. 25-30.

BORZIO, M.; SALERNO, F.; PIANTONI, L.; CAZZANIGA, M.; ANGELI, P.; BISSOLI, F.; BOCCIA, S.; COLLOREDO-MELS, G.; CORIGLIANO, P.; FORNACIARI, G.. Bacterial infection in patients with advanced cirrhosis: a multicentre prospective study. **Digestive And Liver Disease**, v. 33, n. 1, p. 41-48, fev. 2001.

BOULLIER, Séverine; TANGUY, Myriam; KADAOU, Khalil A.; CAUBET, Cécile; SANSONETTI, Philippe; CORTHÉSY, Blaise; PHALIPON, Armelle. Secretory IgA-Mediated Neutralization of *Shigella flexneri* Prevents Intestinal Tissue Destruction by Down-Regulating Inflammatory Circuits. **The Journal Of Immunology**, v. 183, n. 9, p. 5879-5885, 14 out. 2009.

BOURKE, Claire D.; GOUGH, Ethan K.; PIMUNDU, Godfrey; SHONHAI, Annie; BEREJENA, Chipso; TERRY, Louise; BAUMARD, Lucas; CHOUDHRY, Naheed; KARMALI, Yusuf; BWAKURA-DANGAREMBIZI, Mutsa. Cotrimoxazole reduces systemic inflammation in HIV infection by altering the gut microbiome and immune activation. **Science Translational Medicine**, v. 11, n. 486, p. 1-2, 3 abr. 2019

BOUSKRA, Djahida; BRÉZILLON, Christophe; BÉRARD, Marion; WERTS, Catherine; VARONA, Rosa; BONECA, Ivo Gomperts; EBERL, Gérard. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. **Nature**, v. 456, n. 7221, p. 507-510, nov. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Centro Brasileiro de Análise e Planejamento. Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher PNDS 2006: relatório final. Brasília, DF. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/pnds/imag/relatorio_final_pnds2006.pdf>. Acesso em: 8 jan. 2021.

BROOM, Leon J.. The sub-inhibitory theory for antibiotic growth promoters. **Poultry Science**, v. 96, n. 9, p. 3104-3108, set. 2017.

BROWN, Eric M.; WLODARSKA, Marta; WILLING, Benjamin P.; VONAESCH, Pascale; HAN, Jun; REYNOLDS, Lisa A.; ARRIETA, Marie-Claire; UHRIG, Marco; SCHOLZ, Roland; PARTIDA, Oswaldo. Diet and specific microbial exposure trigger features of environmental enteropathy in a novel murine model. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, 4 ago. 2015a.

BROWN, Christopher T.; HUG, Laura A.; THOMAS, Brian C.; SHARON, Itai; CASTELLE, Cindy J.; SINGH, Andrea; WILKINS, Michael J.; WRIGHTON, Kelly C.; WILLIAMS, Kenneth H.; BANFIELD, Jillian F.. Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria. **Nature**, v. 523, n. 7559, p. 208-211, 15 jun. 2015b.

BUFFIE, Charlie G.; JARCHUM, Irene; EQUINDA, Michele; LIPUMA, Lauren; GOBOURNE, Asia; VIALE, Agnes; UBEDA, Carles; XAVIER, Joao; PAMER, Eric G.. Profound Alterations of Intestinal Microbiota following a Single Dose of Clindamycin Results in Sustained Susceptibility to *Clostridium difficile*-Induced Colitis. **Infection And Immunity**, v. 80, n. 1, p. 62-73, 17 out. 2011.

BUNKER, Jeffrey J.; BENDELAC, Albert. IgA Responses to Microbiota. **Immunity**, v. 49, n. 2, p. 211-224, 21 ago. 2018.

CAMILO, Vania; SUGIYAMA, Toshiro; TOUATI, Eliette. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter**, v. 22, set. 2017.

CASTELLE, Cindy J.; BANFIELD, Jillian F.. Major New Microbial Groups Expand Diversity and Alter our Understanding of the Tree of Life. **Cell**, v. 172, n. 6, p. 1181-1197, mar. 2018.

CHALVON-DEMERSAY, Tristan; EVEN, Patrick C; CHAUMONTET, Catherine; PIEDCOQ, Julien; VIOLLET, Benoit; GAUDICHON, Claire; TOMÉ, Daniel; FORETZ, Marc; AZZOUT-MARNICHE, Dalila. Modifying the Dietary Carbohydrate-to-Protein Ratio Alters the Postprandial Macronutrient Oxidation Pattern in Liver of AMPK-Deficient Mice. **The Journal Of Nutrition**, 26 jul. 2017.

CHANG, Pamela V.; HAO, Liming; OFFERMANN, Stefan; MEDZHITOV, Ruslan. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 111, n. 6, p. 2247-2252, 3 jan. 2014.

CHINTU, C; BHAT, G; WALKER, A; MULENGA, V; SINYINZA, F; LISHIMPI, K; FARRELLY, L; KAGANSON, N; A ZUMLA,; GILLESPIE, Sh. Co-trimoxazole as prophylaxis against opportunistic infections in HIV-infected Zambian children (CHAP): a double-blind randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*, [S.L.], v. 364, n. 9448, p. 1865-1871, nov. 2004.

CHISTI, Mohammad Jobayer; GRAHAM, Stephen M.; DUKE, Trevor; AHMED, Tahmeed; FARUQUE, Abu Syed Golam; ASHRAF, Hasan; BARDHAN, Pradip Kumar; SHAHID, Abu S. M. S. B.; SHAHUNJA, K. M.; SALAM, Mohammed Abdus. Post-Discharge Mortality in Children with Severe Malnutrition and Pneumonia in Bangladesh. *Plos One*, [S.L.], v. 9, n. 9, p. 1-2, 16 set. 2014.

CHRISTIE, C. D.; HEIKENS, G. T.; McFARLANE, D. E.;.. Nosocomial and community-acquired infections in malnourished children. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 91, p. 173-80. 1988

CHURCH, James A.; FITZGERALD, Felicity; WALKER, A Sarah; GIBB, Diana M; PRENDERGAST, Andrew J. The expanding role of co-trimoxazole in developing countries. *The Lancet Infectious Diseases*, [S.L.], v. 15, n. 3, p. 327-339, mar. 2015.

CLARKE, Thomas B; DAVIS, Kimberly M; LYSENKO, Elena s; ZHOU, Alice y; YU, Yimin; WEISER, Jeffrey N. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity. **Nature Medicine**, v. 16, n. 2, p. 228-231, 17 jan. 2010.

CLAUSEN, M R; MORTENSEN, P B. Kinetic studies on colonocyte metabolism of short chain fatty acids and glucose in ulcerative colitis. **Gut**, v. 37, n. 5, p. 684-689, 1 nov. 1995.

COATES, M. E.; FULLER, R.; HARRISON, G. F.; LEV, M.; SUFFOLK, S. F.. A comparison of the growth of chicks in the Gustafsson germ-free apparatus and in a conventional environment, with and without dietary supplements of penicillin. **British Journal Of Nutrition**, v. 17, n. 1, p. 141-150, fev. 1963.

CORTÉS-BARBERENA, E.; GONZÁLEZ-MÁRQUEZ, H.; GÓMEZ-OLIVARES, J. L.; ORTIZ-MUÑIZ, R.. Effects of moderate and severe malnutrition in rats on splenic T lymphocyte subsets and activation assessed by flow cytometry. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 152, n. 3, p. 585-592, 29 mar. 2008.

CORWARE, Karina; YARDLEY, Vanessa; MACK, Christopher; SCHUSTER, Steffen; AL-HASSI, Hafid; HERATH, Shanthy; BERGIN, Philip; MODOLELL, Manuel; MUNDER, Markus; MÜLLER, Ingrid. Protein energy malnutrition increases arginase activity in monocytes and macrophages. **Nutrition & Metabolism**, v. 11, n. 1, p. 51, 2014.

CROMWELL, Gary L.. WHY AND HOW ANTIBIOTICS ARE USED IN SWINE PRODUCTION. **Animal Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 7-27, jul. 2002.

CUMMINGS, J. H.; POMARE, E. W.; BRANCH, W. J.; NAYLOR, C. P.; MACFARLANE, G. T.. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. **Gut**, v. 28, n. 10, p. 1221-1227, 1 out. 1987.

CUNNINGHAM-RUNDLES, Susanna; MCNEELEY, David F.; MOON, Aeri. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. **Journal Of Allergy And Clinical Immunology**, v. 115, n. 6, p. 1119-1128, jun. 2005.

DABARD, J.; BRIDONNEAU, C.; PHILLIPE, C.; ANGLADE, P.; MOLLE, D.; NARDI, M.; LADIRÉ, M.; GIRARDIN, H.; MARCILLE, F.; GOMEZ, A.. Ruminococcin A, a New Lantibiotic Produced by a Ruminococcus gnavus Strain Isolated from Human Feces. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4111-4118, 1 set. 2001.

DALVI, Prasad S.; YANG, Steven; SWAIN, Nathan; KIM, Junsoo; SAHA, Senjuti; BOURDON, Celine; ZHANG, Ling; CHAMI, Rose; BANDSMA, Robert H. J.. Long-term metabolic effects of malnutrition: liver steatosis and insulin resistance following early-life protein restriction. **Plos One**, v. 13, n. 7, 2 jul. 2018.

D'AURIA, Giuseppe; PERIS-BONDIA, Francesc; DŽUNKOVÁ, Mária; MIRA, Alex; COLLADO, Maria Carmen; LATORRE, Amparo; MOYA, Andrés. Active and secreted IgA-coated bacterial fractions from the human gut reveal an under-represented microbiota core. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, dez. 2013.

DAVID, Lawrence A.; MAURICE, Corinne F.; CARMODY, Rachel N.; GOOTENBERG, David B.; BUTTON, Julie E.; WOLFE, Benjamin E.; LING, Alisha V.; DEVLIN, A. Sloan; VARMA, Yug; FISCHBACH, Michael A.. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 559-563, 11 dez. 2013.

DEMOINET, Emilie; ROY, Richard. Analysis of Transgenerational Phenotypes Following Acute Starvation in AMPK-Deficient *C. elegans*. **Methods In Molecular Biology**, p. 565-579, 2018.

DIBNER, J.J.; RICHARDS, J.D.. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Science*, [S.L.], v. 84, n. 4, p. 634-643, 1 abr. 2005.

DETHLEFSEN, Les; HUSE, Sue; SOGIN, Mitchell L.; A RELMAN, David. The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. **Plos Biology**, v. 6, n. 11, 18 nov. 2008.

DONALDSON, Gregory P.; LADINSKY, Mark S.; YU, Kristie B.; SANDERS, Jon G.; YOO, B. B.; CHOU, Wen-Chi.; CONNER, Margaret. E.; EARL, Ashlee M.; KNIGHT, Rob; BJORKMAN, Pamela J.. Gut microbiota utilize immunoglobulin A for mucosal colonization. **Science**, v. 360, n. 6390, p. 795-800, 3 maio 2018.

DOWNS, Thomas R.; WILFINGER, William W.. Fluorometric quantification of DNA in cells and tissue. **Analytical Biochemistry**, v. 131, n. 2, p. 538-547, jun. 1983.

D'SOUZA, Alaric W; MOODLEY-GOVENDER, Eshia; BERLA, Bertram; KELKAR, Tejas; WANG, Bin; SUN, Xiaoqing; DANIELS, Brodie; COUTSODIS, Anna; TREHAN, Indi; DANTAS, Gautam. Cotrimoxazole Prophylaxis Increases Resistance Gene Prevalence and α -Diversity but Decreases β -Diversity in the Gut Microbiome of Human Immunodeficiency Virus–Exposed, Uninfected Infants. **Clinical Infectious Diseases**, 13 dez. 2019.

EDLUND, Charlotta; BARKHOLT, Lisbeth; OLSSON–LILJEQUIST, Barbro; NORD, Carl Erik. Effect of Vancomycin on Intestinal Flora of Patients Who Previously Received Antimicrobial Therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, n. 3, p. 729-732, set. 1997.

EL NAWAWY, A.; BARAKAT, S.; EL WALILY, T.; ABDEL MONEIM, D. A.; HUSSEIN, M. Evaluation of erythropoiesis in protein energy malnutrition. **Eastern Mediterranean Health Journal**, v. 2-3, n. 8, p. 281-289, 1 jan. 2002.

EYZAGUIRRE-VELÁSQUEZ, Johana; OLAVARRÍA-RAMÍREZ, Loreto; GONZÁLEZ-ARANCIBIA, Camila; DÍAZ-MERINO, Camila; ARIZ, Raúl; LÓPEZ, Silvana; QUIROZ, Waldo; BELTRÁN, Caroll J.; BRAVO, Javier A.; JULIO-PIEPER, Marcela. Protein Malnutrition During Juvenile Age Increases Ileal and Colonic Permeability in Rats. **Journal Of Pediatric Gastroenterology And Nutrition**, v. 64, n. 5, p. 707-712, 30 abr. 2017.

FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO: The State of Food Security and Nutrition in the World 2017. Building resilience for peace and food security. Rome, **FAO**, 2017. <http://www.fao.org/3/a-I7695e.pdf> (acesso Janeiro, 2020).

FERNANDEZ, M. Isabel; PEDRON, Thierry; TOURNEBIZE, Régis; OLIVO-MARIN, Jean-Christophe; SANSONETTI, Philippe J; PHALIPON, Armelle. Anti-Inflammatory Role for Intracellular Dimeric Immunoglobulin A by Neutralization of Lipopolysaccharide in Epithelial Cells. **Immunity**, v. 18, n. 6, p. 739-749, jun. 2003.

FLORÊNCIO, Telma Maria de Menezes Toledo; FERREIRA, Haroldo da Silva; FRANÇA, Anna Patrícia Tojal de; CAVALCANTE, Jairo Calado; SAWAYA, Ana Lydia. Obesity and undernutrition in a very-low-income population in the city of Maceió, northeastern Brazil. **British Journal Of Nutrition**, [S.L.], v. 86, n. 2, p. 277-283, ago. 2001.

FILTEAU, S. M.; WOODWARD, Bill. The Effect of Severe Protein Deficiency on Serum Zinc Concentration of Mice Fed a Requirement Level or a Very High Level of Dietary Zinc. **The Journal Of Nutrition**, v. 112, n. 10, p. 1974-1977, 1 out. 1982.

FISHER, Bernard J.; KRASKAUSKAS, Donatas; MARTIN, Erika J.; FARKAS, Daniela; WEGELIN, Jacob A.; BROPHY, Donald; WARD, Kevin R.; VOELKEL, Norbert F.; FOWLER, Alpha A.; NATARAJAN, Ramesh. Mechanisms of attenuation of abdominal sepsis induced acute lung injury by ascorbic acid. **American Journal Of Physiology-Lung Cellular And Molecular Physiology**, v. 303, n. 1, 1 jul. 2012.

FISHER, Bernard J.; SEROPIAN, Ignacio M.; KRASKAUSKAS, Donatas; THAKKAR, Jay N.; VOELKEL, Norbert F.; FOWLER, Alpha A.; NATARAJAN, Ramesh. Ascorbic acid attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Critical Care Medicine**, v. 39, n. 6, p. 1454-1460, jun. 2011.

FONTANA, Luigi; PARTRIDGE, Linda; LONGO, Valter D.. Extending Healthy Life Span--From Yeast to Humans. **Science**, v. 328, n. 5976, p. 321-326, 15 abr. 2010.

FOLLIS, R. H.. A Kwashiorkor-Like Syndrome Observed in Monkeys Fed Maize. **Experimental Biology And Medicine**, v. 96, n. 2, p. 523-528, 1 nov. 1957

FURUSAWA, Yukihiro; OBATA, Yuuki; FUKUDA, Shinji; ENDO, Takaho A.; NAKATO, Gaku; TAKAHASHI, Daisuke; NAKANISHI, Yumiko; UETAKE, Chikako; KATO, Keiko; KATO, Tamotsu. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. **Nature**, v. 504, n. 7480, p. 446-450, 13 nov. 2013.

FOUHY, Fiona; DEANE, Jennifer; REA, Mary C.; O'SULLIVAN, Órla; ROSS, R. Paul; O'CALLAGHAN, Grace; PLANT, Barry J.; STANTON, Catherine. The Effects of Freezing on Faecal Microbiota as Determined Using MiSeq Sequencing and Culture-Based Investigations. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. 1-2, 6 mar. 2015.

GALDEANO, Carolina Maldonado; NÓÑEZ, Ivanna Novotny; LEBLANC, Alejandra de Moreno de; CARMUEGA, Esteban; WEILL, Ricardo; PERDIGÓN, Gabriela. Impact of a probiotic fermented milk in the gut ecosystem and in the systemic immunity using a non-severe protein-energy-malnutrition model in mice. **Bmc Gastroenterology**, v. 11, 26 maio 2011.

GASKINS, H. R.; COLLIER, C. T.; ANDERSON, D. B.. ANTIBIOTICS AS GROWTH PROMOTANTS: mode of action. *Animal Biotechnology*, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 29-42, jul. 2002.

GEHRIG, Jeanette L.; VENKATESH, Siddarth; CHANG, Hao-Wei; HIBBERD, Matthew C.; KUNG, Vanderlene L.; CHENG, Jiye; CHEN, Robert Y.; SUBRAMANIAN, Sathish; COWARDIN, Carrie A.; MEIER, Martin F.. Effects of microbiota-directed foods in gnotobiotic animals and undernourished children. **Science**, v. 365, n. 6449, p. 732-800, 11 jul. 2019.

GILMARTIN, Allissia A.; PETRI, William A.. Exploring the role of environmental enteropathy in malnutrition, infant development and oral vaccine response. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1671, 19 jun. 2015.

GRASA, Laura; ABECIA, Leticia; FORCÉN, Raquel; CASTRO, Marta; JALÓN, José Antonio García de; LATORRE, Eva; ALCALDE, Ana Isabel; MURILLO, María Divina. Antibiotic-Induced Depletion of Murine Microbiota Induces Mild Inflammation and Changes in Toll-Like Receptor Patterns and Intestinal Motility. **Microbial Ecology**, [S.L.], v. 70, n. 3, p. 835-848, 21 abr. 2015.

GRAY, Thomas; KOO, Ja-Seok; NETTESHEIM, Paul. Regulation of mucous differentiation and mucin gene expression in the tracheobronchial epithelium. **Toxicology**, v. 160, n. 1-3, p. 35-46, 7 mar. 2001.

GROVER, Zubin; EE, Looi C.. Protein Energy Malnutrition. **Pediatric Clinics Of North America**, v. 56, n. 5, p. 1055-1068, 30 set. 2009.

HARNED, B. K; CUNNINGHAM, Raymond W.; CLARCK, Mary C.; CLARCK, Mary C.; COSGROVE, Rachel; HINE, Carolyn H.; McCAULEY W. J.; STOCKEY, Edgar; VESSEY, R. E; YUDA, N. N; SUBBAROW, Y. The pharmacology of Duomycin. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, 51:182-210, 1948.

HE, Xiyue; YAN, Juan; ZHU, Xiaotong; WANG, Qinghui; PANG, Wei; QI, Zanmei; WANG, Meilian; LUO, Enjie; PARKER, Daniel M.; CANTORNA, Margherita T.. Vitamin D Inhibits the Occurrence of Experimental Cerebral Malaria in Mice by

Suppressing the Host Inflammatory Response. **The Journal Of Immunology**, v. 193, n. 3, p. 1314-1323, 25 jun. 2014.

HILDEBRANDT, Marie A.; HOFFMANN, Christian; SHERRILL-MIX, Scott A.; KEILBAUGH, Sue A.; HAMADY, Micah; CHEN, Ying-Yu; KNIGHT, Rob; AHIMA, Rexford S.; BUSHMAN, Frederic; WU, Gary D.. High-Fat Diet Determines the Composition of the Murine Gut Microbiome Independently of Obesity. **Gastroenterology**, v. 137, n. 5, p. 1716-1724, nov. 2009.

HILL, Tom C.J.; WALSH, Kerry A.; HARRIS, James A.; MOFFETT, Bruce F.. Using ecological diversity measures with bacterial communities. **Fems Microbiology Ecology**, v. 43, n. 1, p. 1-11, fev. 2003.

HSIAO, Ansel; AHMED, A. M. Shamsir; SUBRAMANIAN, Sathish; GRIFFIN, Nicholas W.; DREWRY, Lisa L.; PETRI, William A.; HAQUE, Rashidul; AHMED, Tahmeed; GORDON, Jeffrey I.. Members of the human gut microbiota involved in recovery from *Vibrio cholerae* infection. **Nature**, v. 515, n. 7527, p. 423-426, 17 set. 2014.

HOFFMANN, Fukun W.; HASHIMOTO, Ann C.; SHAFER, Leigh Anne; DOW, Steven; BERRY, Marla J.; HOFFMANN, Peter R.. Dietary Selenium Modulates Activation and Differentiation of CD4+ T Cells in Mice through a Mechanism Involving Cellular Free Thiols. **The Journal Of Nutrition**, v. 140, n. 6, p. 1155-1161, 7 abr. 2010.

HOOPER, L. V.; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J.. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1268-1273, 6 jun. 2012.

HOOPER, Lora V.; MACPHERSON, Andrew J.. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 3, p. 159-169, mar. 2010.

HUGENHOLTZ, Floor; VOS, Willem M. de. Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation. **Cellular And Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 1, p. 149-160, 9 nov. 2017.

HUGHES, Jennifer B.; HELLMANN, Jessica J.; RICKETTS, Taylor H.; BOHANNAN, Brendan J. M.. Counting the Uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4399-4406, 1 out. 2001.

IBRAHIM, Marwa K.; ZAMBRUNI, Mara; MELBY, Christopher L.; MELBY, Peter C.. Impact of Childhood Malnutrition on Host Defense and Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 4, p. 919-971, 2 ago. 2017.

ICHINOHE, T.; PANG, I. K.; KUMAMOTO, Y.; PEAPER, D. R.; HO, J. H.; MURRAY, T. S.; IWASAKI, A.. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 108, n. 13, p. 5354-5359, 14 mar. 2011.

IFPRI: Global Nutrition Report 2016: From Promise to Impact: Ending Malnutrition by 2030. Washington, DC, **IFPRI**, 2016.

<http://ebrary.ifpri.org/utils/getfile/collection/p15738coll2/id/130354/filename/130565.pdf>
(acesso Janeiro, 2020).

IFPRI: Global Nutrition Report 2018: From Promise to Impact: Ending Malnutrition by 2030. Washington, DC, **IFPRI**, 2019.

<https://globalnutritionreport.org/reports/global-nutrition-report-2018/infantandchildren/en/>>. Acesso em jul. 2020.

ISAAC, Sandrine; SCHER, Jose U.; DJUKOVIC, Ana; JIMÉNEZ, Nuria; LITTMAN, Dan R.; ABRAMSON, Steven B.; PAMER, Eric G.; UBEDA, Carles. Short- and long-term effects of oral vancomycin on the human intestinal microbiota. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, [S.L.], v. 72, n. 1, p. 128-136, 5 out. 2016.

ISMAIL, A. S.; SEVERSON, K. M.; VAISHNAVA, S.; BEHRENDT, C. L.; YU, X.; BENJAMIN, J. L.; RUHN, K. A.; HOU, B.; DEFRANCO, A. L.; YAROVINSKY, F.. $\gamma\delta$ intraepithelial lymphocytes are essential mediators of host-microbial homeostasis at the intestinal mucosal surface. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 108, n. 21, p. 8743-8748, 9 maio 2011.

JERNBERG, Cecilia; LÖFMARK, Sonja; EDLUND, Charlotta; JANSSON, Janet K. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. **The Isme Journal**, v. 1, n. 1, p. 56-66, maio 2007.

JONES, Kelsey D.; THITIRI, Johnstone; NGARI, Moses; BERKLEY, James A.. Childhood Malnutrition: toward an understanding of infections, inflammation, and antimicrobials. *Food And Nutrition Bulletin*, v. 35, n. 2, p. 64-70, jun. 2014.

JOSEFSDOTTIR, Kamilla S.; BALDRIDGE, Megan T.; KADMON, Claudine S.; KING, Katherine Y.. Antibiotics impair murine hematopoiesis by depleting the intestinal microbiota. **Blood**, v. 129, n. 6, p. 729-739, 9 fev. 2017.

JUKES, T. H.; STOKSTAD, E. L. R.; TAYLOE, R. R.; CUNHA, T. J.; EDWARDS, H. M.; MEADOWS, G. B. Growth-promoting effect of aureomycin on pigs. **Archives Biochemistry**, v. 26, p. 324-325, abr. 1950.

KAMADA, Nobuhiko; NÓÑEZ, Gabriel. Role of the Gut Microbiota in the Development and Function of Lymphoid Cells. **The Journal Of Immunology**, v. 190, n. 4, p. 1389-1395, 1 fev. 2013.

KANE, Anne V.; DINH, Duy M.; WARD, Honorine D.. Childhood malnutrition and the intestinal microbiome. **Pediatric Research**, v. 77, n. 1-2, p. 256-262, 30 out. 2014.

KELLER, Ulrich. Nutritional Laboratory Markers in Malnutrition. **Journal Of Clinical Medicine**, v. 8, n. 6, 31 maio 2019.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H.. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 94, n. 19, p. 10409-10414, 16 set. 1997.

KAU, Andrew L.; PLANER, Joseph D.; LIU, Jie; RAO, Sindhuja; YATSUNENKO, Tanya; TREHAN, Indi; MANARY, Mark J.; LIU, Ta-Chiang; STAPPENBECK, Thaddeus S.; MALETA, Kenneth M.. Functional characterization of IgA-targeted bacterial taxa from undernourished

Malawian children that produce diet-dependent enteropathy. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 276, 25 fev. 2015.

KERAC, Marko; BUNN, James; CHAGALUKA, George; BAHWERE, Paluku; TOMKINS, Andrew; COLLINS, Steve; SEAL, Andrew. Follow-Up of Post-Discharge Growth and Mortality after Treatment for Severe Acute Malnutrition (FuSAM Study): a prospective cohort study. *Plos One*, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 1-2, 3 jun. 2014.

KEUSCH, Gerald T.; DENNO, Donna M.; BLACK, Robert E.; DUGGAN, Christopher; GUERRANT, Richard L.; LAVERY, James V.; NATARO, James P.; ROSENBERG, Irwin H.; RYAN, Edward T.; TARR, Phillip I.. Environmental Enteric Dysfunction: pathogenesis, diagnosis, and clinical consequences. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 4, p. 207-212, 1 nov. 2014.

KIELMANN, Arnfrieda.; MCCORD, Colin. WEIGHT-FOR-AGE AS AN INDEX OF RISK OF DEATH IN CHILDREN. **The Lancet**, v. 311, n. 8076, p. 1247-1250, jun. 1978.

KIM, Yong Sung; UNNO, Tatsuya; KIM, Byung-Yong; PARK, Mi-Sung. Sex Differences in Gut Microbiota. **The World Journal Of Men'S Health**, v. 38, n. 1, p. 48-61, 2020.

KITAMURA, Hidemitsu; MORIKAWA, Hideyuki; KAMON, Hokuto; IGUCHI, Megumi; HOJYO, Shintaro; FUKADA, Toshiyuki; YAMASHITA, Susumu; KAISHO, Tsuneyasu; AKIRA, Shizuo; MURAKAMI, Masaaki. Toll-like receptor-mediated regulation of zinc homeostasis influences dendritic cell function. **Nature Immunology** v. 7, n. 9, p. 971-977, 6 ago. 2006.

KNOEBEL, Leon K.; BLACK, Alex. The Influence of Vitamin B12 and Antibiotics on Protein and Energy Utilization in a Low Protein Diet. **The Journal Of Nutrition**, v. 48, n. 4, p. 477-487, 1 dez. 1952.

LANGE, Kathleen; BUERGER, Martin; STALLMACH, Andreas; BRUNS, Tony. Effects of Antibiotics on Gut Microbiota. *Digestive Diseases*, [S.L.], v. 34, n. 3, p. 260-268, 2016.

KORPELA, Katri; SALONEN, Anne; VIRTA, Lauri J.; KEKKONEN, Riina A.; FORSLUND, Kristoffer; BORK, Peer; VOS, Willem M. de. Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish pre-school children. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 1-2, 26 jan. 2016

LACOCHEIERE, M. F. de; DURAND, T.; LEPAGE, P.; BOURREILLE, A.; GALMICHE, J. P.; DORE, J.. Resilience of the Dominant Human Fecal Microbiota upon Short-Course Antibiotic Challenge. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5588-5592, 1 nov. 2005.

LAGISHETTY, Venu; LIU, Nancy Q.; HEWISON, Martin. Vitamin D metabolism and innate immunity. **Molecular And Cellular Endocrinology**, v. 347, n. 1-2, p. 97-105, dez. 2011.

LANGE, Kathleen; BUERGER, Martin; STALLMACH, Andreas; BRUNS, Tony. Effects of Antibiotics on Gut Microbiota. **Digestive Diseases**, v. 34, n. 3, p. 260-268, 2016.

LANGFORD, Dale J; BAILEY, Andrea L; CHANDA, Mona Lisa; CLARKE, Sarah e; DRUMMOND, Tanya e; ECHOLS, Stephanie; GLICK, Sarah; INGRAO, Joelle; KLASSEN-ROSS, Tammy; LACROIX-FRALISH, Michael L. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nature Methods**, v. 7, n. 6, p.447-449, 9 maio 2010.

LAZZERINI, Marzia; TICKELL, David. Antibiotics in severely malnourished children:

systematic review of efficacy, safety and pharmacokinetics. *Bulletin Of The World Health Organization*, [S.L.], v. 89, n. 8, p. 594-607, 20 maio 2011.

LAWLEY, Trevor D.; CLARE, Simon; WALKER, Alan W.; GOULDING, David; STABLER, Richard A.; CROUCHER, Nicholas; MASTROENI, Piero; SCOTT, Paul; RAISEN, Claire; MOTTRAM, Lynda. Antibiotic Treatment of *Clostridium difficile* Carrier Mice Triggers a Supershedder State, Spore-Mediated Transmission, and Severe Disease in Immunocompromised Hosts. ***Infection And Immunity***, v. 77, n. 9, p. 3661-3669, 29 jun. 2009.

LEANDRO-MERHI, Vânia Aparecida; BRÁZ, Vitória Negri; AQUINO, José Luis Braga de. Is total lymphocyte count related to nutritional markers in hospitalized older adults? ***Arquivos de Gastroenterologia***, v. 54, n. 1, p. 79-82, mar. 2017.

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

LEUR, Joris J. J. P. M. van de; VOLLAARD, Ernst J.; JANSSEN, Anton J. H. M.; DOFFERHOFF, Anthonius S. M.. Influence of Low Dose Ciprofloxacin on Microbial Colonization of the Digestive Tract in Healthy Volunteers During Normal and During Impaired Colonization Resistance. ***Scandinavian Journal Of Infectious Diseases***, v. 29, n. 3, p. 297-300, jan. 1997.

LEY, Ruth E.; PETERSON, Daniel A.; GORDON, Jeffrey I.. Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. *Cell*, [S.L.], v. 124, n. 4, p. 837-848, fev. 2006.

MACDOUGALL, L. G. The Effect of Aureomycin on Undernourished African Children. ***J Tropical Pediatrics***, 1957.

LEY, Ruth E.; TURNBAUGH, Peter J.; KLEIN, Samuel; GORDON, Jeffrey I.. Human gut microbes associated with obesity. ***Nature***, v. 444, n. 7122, p. 1022-1023, dez. 2006.

LOFMARK, S.; JERNBERG, C.; JANSSON, J. K.; EDLUND, C.. Clindamycin-induced enrichment and long-term persistence of resistant *Bacteroides spp.* and resistance genes. ***Journal Of Antimicrobial Chemotherapy***, v. 58, n. 6, p. 1160-1167, 20 out. 2006.

MACIA, Laurence; TAN, Jian; VIEIRA, Angelica T.; LEACH, Katie; STANLEY, Dragana; LUONG, Suzanne; MARUYA, Mikako; MCKENZIE, Craig Ian; HIJIKATA, Atsushi; WONG, Connie. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. ***Nature Communications***, v. 6, n. 1, p. 1-3, 1 abr. 2015.

MANDOMANDO, Inácio; ESPASA, Mateu; NHAMPOSSA, Tacilta; ROCA, Anna; SIGAÐQUE, Betuel; MENÉNDEZ, Clara; MACETE, Eusébio; MACHEVO, Sónia; ALONSO, Pedro L.; QUINTO, Llorenç. Antimicrobial Drug Resistance Trends of Bacteremia Isolates in a Rural Hospital in Southern Mozambique. ***The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene***, v. 83, n. 1, p. 152-157, 1 jul. 2010

MANHART, Nicole; VIERLINGER, Klemens; BERGMEISTER, Helga; BOLTZ-NITULESCU, George; SPITTLER, Andreas; ROTH, Erich. Influence of short-term protein malnutrition of

mice on the phenotype and costimulatory signals of lymphocytes from spleen and Peyer's patches. **Nutrition**, v. 16, n. 3, p. 197-201, mar. 2000

MASLOWSKI, Kendle M.; VIEIRA, Angelica T.; NG, Aylwin; KRANICH, Jan; SIERRA, Frederic; YU, Di; SCHILTER, Heidi C.; ROLPH, Michael S.; MACKAY, Fabienne; ARTIS, David. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. **Nature**, v. 461, n. 7268, p. 1282-1286, 29 out. 2009.

MASTERS, Philip A.; O'BRYAN, Thomas A.; ZURLO, John; MILLER, Debra Q.; JOSHI, Nirmal. Trimethoprim-Sulfamethoxazole Revisited. *Archives Of Internal Medicine*, [S.L.], v. 163, n. 4, p. 402, 24 fev. 2003.

McCAY, C. M.; CROWELL, Mary F.; MAYNARD, L. A.. The Effect of Retarded Growth Upon the Length of Life Span and Upon the Ultimate Body Size. **The Journal Of Nutrition**, v. 10, n. 1, p. 63-79, 1 jul. 1935.

McCAY, C.M.; SPERLING, G.; BARNES, L.L.. Growth, Ageing, chronic diseases and life span in rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 2, p 249, 1943.

McGUCKIN, Michael A.; LINDÉN, Sara K.; SUTTON, Philip; FLORIN, Timothy H.. Mucin dynamics and enteric pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 265-278, 16 mar. 2011.

McLOUGHLIN, Kirstie; SCHLUTER, Jonas; RAKOFF-NAHOUM, Seth; SMITH, Adrian L.; FOSTER, Kevin R.. Host Selection of Microbiota via Differential Adhesion. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n. 4, p. 550-559, 13 abr. 2016.

MEDEIROS, Pedro Henrique Q.s.; LEDWABA, Solanka E.; BOLICK, David T.; GIALLOUROU, Natasa; YUM, Lauren K.; COSTA, Deiziane V.s.; ORIÁ, Reinaldo B.; BARRY, Eileen M.; SWANN, Jonathan R.; LIMA, Aldo Ângelo M.. A murine model of diarrhea, growth impairment and metabolic disturbances with *Shigella flexneri* infection and the role of zinc deficiency. **Gut Microbes**, v. 10, n. 5, p. 615-630, 3 fev. 2019.

MENNI, C; A JACKSON, M; PALLISTER, T; STEVES, C J; SPECTOR, T D; VALDES, A M. Gut microbiome diversity and high-fibre intake are related to lower long-term weight gain. **International Journal Of Obesity**, v. 41, n. 7, p. 1099-1105, 13 mar. 2017.

MICHAEL, Husheem; LANGEL, Stephanie N.; MIYAZAKI, Ayako; PAIM, Francine C.; CHEPNGENO, Juliet; ALHAMO, Moyasar A.; FISCHER, David D.; SRIVASTAVA, Vishal; KATHAYAT, Dipak; DEBLAIS, Loic. Malnutrition Decreases Antibody Secreting Cell Numbers Induced by an Oral Attenuated Human Rotavirus Vaccine in a Human Infant Fecal Microbiota Transplanted Gnotobiotic Pig Model. **Frontiers In Immunology**, v. 11, p. 1-2, 14 fev. 2020.

MITTAL, A.; WOODWARD, B.. Thymic Epithelial Cells of Severely Undernourished Mice: accumulation of cholesteryl esters and absence of cytoplasmic vacuoles. **Experimental Biology And Medicine**, v. 178, n. 3, p. 385-391, 1 mar. 1985.

MOHAMMED, Bassem M.; FISHER, Bernard J.; HUYNH, Quoc K.; WIJESINGHE, Dayanjan S.; CHALFANT, Charles E.; BROPHY, Donald F.; III, Alpha A. Fowler; NATARAJAN, Ramesh. Resolution of Sterile Inflammation: role for vitamin c. **Mediators Of Inflammation**, v. 2014, p. 1-15, 9 set. 2014.

MORELLI, Lorenzo. Postnatal Development of Intestinal Microflora as Influenced by Infant Nutrition. **The Journal Of Nutrition**, v. 138, n. 9, p. 1791-1795, 1 set. 2008.

MOOR, Kathrin; DIARD, Médéric; SELLIN, Mikael E.; FELMY, Boas; WOTZKA, Sandra Y.; TOSKA, Albulena; BAKKEREN, Erik; ARNOLDINI, Markus; BANSEPT, Florence; CO, Alma dal. High-avidity IgA protects the intestine by enchainning growing bacteria. **Nature**, v. 544, n. 7651, p. 498-502, 12 abr. 2017.

MOORE, P. R; EVENSON, A; LUCKEY, T. D; McCOY, E; ELVEHJEM, C. A; HART, E. B.. Use of Sulfasuxidine, Streptothricin, and Streptomycin in nutritional studies with the chick. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 165, p. 437-441, 27 jun. 1946.

NÁJERA, O.; GONZÁLEZ, C.; CORTÉS, E.; BETANCOURT, M.; ORTIZ, R.; TOLEDO, G.; LÓPEZ, L.. Early Activation of T, B and NK Lymphocytes in Infected Malnourished and Infected Well-Nourished Children. **Journal Of Nutritional Immunology**, v. 5, n. 3-4, p. 85-97, 6 mar. 2002.

NATIVIDAD, Jane M.; LAMAS, Bruno; PHAM, Hang Phuong; MICHEL, Marie-Laure; RAINTEAU, Dominique; BRIDONNEAU, Chantal; COSTA, Gregory da; VLIEG, Johan van Hylckama; SOVRAN, Bruno; CHAMIGNON, Celia. *Bilophila wadsworthia* aggravates high fat diet induced metabolic dysfunctions in mice. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1-2, 18 jul. 2018.

NEL, Etienne. Severe acute malnutrition. **Current Opinion In Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 21, n. 3, p. 195-199, maio 2018.

NGUYEN, T. L. A.; VIEIRA-SILVA, S.; LISTON, A.; RAES, J.. How informative is the mouse for human gut microbiota research? **Disease Models & Mechanisms**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 1 jan. 2015.

NYBERG, Sofia D.; ÖSTERBLAD, Monica; HAKANEN, Antti J.; LÖFMARK, Sonja; EDLUND, Charlotta; HUOVINEN, Pentti; JALAVA, Jari. Long-term antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from human intestinal microbiota after administration of clindamycin. **Scandinavian Journal Of Infectious Diseases**, v. 39, n. 6-7, p. 514-520, jan. 2007.

NOORANI, N.; MACHARIA, W. M.; OYATSI, D.; REVATHI, G.. Bacterial isolates in severely malnourished children at Kenyatta National Hospital, Nairobi. *East Afr Med J* 2005; 82: 343-8
ONU. TRANSFORMING OUR WORLD: THE 2030 AGENDA FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT. A/RES/70/1. **United Nations**, 2015.

NÚÑEZ, Ivanna Novotny; GALDEANO, Carolina Maldonado; CARMUEGA, Esteban; WEILL, Ricardo; LEBLANC, Alejandra de Moreno de; PERDIGÓN, Gabriela. Effect of a probiotic fermented milk on the thymus in Balb/c mice under non-severe protein–energy malnutrition. **British Journal Of Nutrition**, v. 110, n. 3, p. 500-508, 3 jan. 2013.

OCHOA-REPÁRAZ, Javier; MIELCARZ, Daniel W.; DITRIO, Lauren E.; BURROUGHS, Ashley R.; FOUREAU, David M.; HAQUE-BEGUM, Sakhina; KASPER, Lloyd H.. Role of Gut Commensal Microflora in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal Of Immunology**, v. 183, n. 10, p. 6041-6050, 19 out. 2009.

OGAWA, M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 11, n. 81, 1 jun. 1993.

OHIRA, Hideo; FUJIOKA, Yoshio; KATAGIRI, Chikae; MAMOTO, Rie; AOYAMA-ISHIKAWA, Michiko; AMAKO, Katsumi; IZUMI, Yoshihiro; NISHIUMI, Shin; YOSHIDA, Masaru; USAMI, Makoto. Butyrate Attenuates Inflammation and Lipolysis Generated by the Interaction of Adipocytes and Macrophages. **Journal Of Atherosclerosis And Thrombosis**, p. 425-442, 2013.

OKEKE, Iruka N.; ABODERIN, Oladiipo A.; BYARUGABA, Denis K.; OJO, Kayode K.; OPINTAN, Japheth A.. Growing Problem of Multidrug-Resistant Enteric Pathogens in Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 11, p. 1640-1646, nov. 2007.

OSBORNE, T. B.; MENDEL, L. B.; FERRY, E. L.. The effect of retardation of growth upon the breeding period and duration of life of rats. **Science**, v. 45, n. 1160, p. 294-295, 23 mar. 1917.

OZATO, Naoki; SAITO, Shinichiro; YAMAGUCHI, Tohru; KATASHIMA, Mitsuhiro; TOKUDA, Itoyo; SAWADA, Kaori; KATSURAGI, Yoshihisa; KAKUTA, Masanori; IMOTO, Seiya; IHARA, Kazushige. *Blautia* genus associated with visceral fat accumulation in adults 20–76 years of age. **Npj Biofilms And Microbiomes**, v. 5, n. 1, 4 out. 2019.

PALM, Noah W.; DE ZOETE, Marcel R.; CULLEN, Thomas W.; BARRY, Natasha A.; STEFANOWSKI, Jonathan; HAO, Liming; DEGNAN, Patrick H.; HU, Jianzhong; PETER, Inga; ZHANG, Wei. Immunoglobulin A Coating Identifies Colitogenic Bacteria in Inflammatory Bowel Disease. **Cell**, v. 158, n. 5, p. 1000-1010, 28 ago. 2014.

PAN, Fengwei; ZHANG, Liying; LI, Min; HU, Yingxin; ZENG, Benhua; YUAN, Huijuan; ZHAO, Liping; ZHANG, Chenhong. Predominant gut *Lactobacillus murinus* strain mediates anti-inflammatory effects in calorie-restricted mice. **Microbiome**, v. 6, n. 1, 21 mar. 2018.

PANDA, Suchita; KHADER, Ismail El; CASELLAS, Francesc; VIVANCOS, Josefa López; CORS, Montserrat García; SANTIAGO, Alba; CUENCA, Silvia; GUARNER, Francisco; MANICHANH, Chaysavanh. Short-Term Effect of Antibiotics on Human Gut Microbiota. **Plos One**, v. 9, n. 4, 18 abr. 2014.

PARK, Chan Yoon; PARK, Soyoun; KIM, Min Soo; KIM, Hye-Kyeong; HAN, Sung Nim. Effects of mild calorie restriction on lipid metabolism and inflammation in liver and adipose tissue. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 490, n. 3, p. 636-642, ago. 2017.

PARKER, Kristopher D.; ALBEKE, Shannon E.; GIGLEY, Jason P.; GOLDSTEIN, Allan M.; WARD, Naomi L.. Microbiome Composition in Both Wild-Type and Disease Model Mice Is Heavily Influenced by Mouse Facility. **Frontiers In Microbiology**, v. 9, 20 jul. 2018.

PAVERT, Serge A. van de; FERREIRA, Manuela; DOMINGUES, Rita G.; RIBEIRO, Hélder; MOLENAAR, Rosalie; MOREIRA-SANTOS, Lara; ALMEIDA, Francisca F.; IBIZA, Sales; BARBOSA, Inês; GOVERSE, Gera. Maternal retinoids control type 3 innate lymphoid cells and set the offspring immunity. **Nature**, v. 508, n. 7494, p. 123-127, 19 mar. 2014.

PETERSON, Daniel A.; MCNULTY, Nathan P.; GURUGE, Janaki L.; GORDON, Jeffrey I.. IgA Response to Symbiotic Bacteria as a Mediator of Gut Homeostasis. **Cell Host & Microbe**, v. 2, n. 5, p. 328-339, 15 nov. 2007.

PETERSON, Lance W.; ARTIS, David. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 3, p. 141-153, 25 fev. 2014.

PREIDIS, Geoffrey A.; SAULNIER, Delphine M.; BLUTT, Sarah E.; MISTRETTA, Toni-Ann; RIEHLE, Kevin P.; MAJOR, Angela M.; VENABLE, Susan F.; BARRISH, James P.; FINEGOLD, Milton J.; PETROSINO, Joseph F.. Host Response to Probiotics Determined by Nutritional Status of Rotavirus-infected Neonatal Mice. **Journal Of Pediatric Gastroenterology And Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 299-307, set. 2012.

PRENDERGAST, Andrew J.; RUKOBO, Sandra; CHASEKWA, Bernard; MUTASA, Kuda; NTOZINI, Robert; MBUYA, Mduduzi N. N.; JONES, Andrew; MOULTON, Lawrence H.; STOLTZFUS, Rebecca J.; HUMPHREY, Jean H.. Stunting Is Characterized by Chronic Inflammation in Zimbabwean Infants. **Plos One**, v. 9, n. 2, 18 fev. 2014.

PRENDERGAST, Andrew; KELLY, Paul. Enteropathies in the Developing World: neglected effects on global health. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 86, n. 5, p. 756-763, 1 maio 2012.

PRENDERGAST, Andrew; WALKER, A. Sarah; MULENGA, Veronica; CHINTU, Chifumbe; GIBB, Diana M.. Improved Growth and Anemia in HIV-Infected African Children Taking Cotrimoxazole Prophylaxis. *Clinical Infectious Diseases*, [S.L.], v. 52, n. 7, p. 953-956, 22 mar. 2011

PRYDE, Susan e; DUNCAN, Sylvia H; HOLD, Georgina L; STEWART, Colin s; FLINT, Harry J. The microbiology of butyrate formation in the human colon. **Fems Microbiology Letters**, v. 217, n. 2, p. 133-139, dez. 2002.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 27 nov. 2012.

RABASA, A. I.. Urinary Tract Infection in Severely Malnourished Children at the University of Maiduguri Teaching Hospital. *Journal Of Tropical Pediatrics*, [S.L.], v. 48, n. 6, p. 359-361, 1 dez. 2002.

RICHARDSON, Claire. **Humane Endpoints**. 2014. NC3Rs. <https://www.nc3rs.org.uk/humane-endpoints>. (acesso Janeiro 2020).

RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, Mirjana; VOS, Willem M. de. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. **Fems Microbiology Reviews**, v. 38, n. 5, p. 996-1047, set. 2014.

RAVELLI, Gian-Paolo; STEIN, Zena A.; SUSSER, Mervyn W.. Obesity in Young Men after Famine Exposure in Utero and Early Infancy. **New England Journal Of Medicine**, v. 295, n. 7, p. 349-353, 12 ago. 1976.

REIKVAM, Dag Henrik; EROFEEV, Alexander; SANDVIK, Anders; GRCIC, Vedrana; JAHNSEN, Frode Lars; GAUSTAD, Peter; MCCOY, Kathy D.; MACPHERSON, Andrew J.; MEZA-ZEPEDA, Leonardo A.; JOHANSEN, Finn-Eirik. Depletion of Murine Intestinal Microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. **Plos One**, v. 6, n. 3, 21 mar. 2011.

RIDAURA, V. K.; FAITH, J. J.; REY, F. E.; CHENG, J.; DUNCAN, A. E.; KAU, A. L.; GRIFFIN, N. W.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B.; BAIN, J. R.. Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. **Science**, v. 341, n. 6150, 5 set. 2013.

ROBERTSON, Ruairi C.. The Gut Microbiome in Child Malnutrition. **Global Landscape Of Nutrition Challenges In Infants And Children**, p. 133-144, 2020.

ROGNES, T. et al. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. **PeerJ**, v. 4, n. 10, p. e2584, 18 out. 2016.

ROSS, A Catharine. Vitamin A and retinoic acid in T cell-related immunity. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, v. 96, n. 5, 10 out. 2012.

RUDRARAJU, Rajeev; JONES, Bart G.; SURMAN, Sherri L.; SEALY, Robert E.; THOMAS, Paul G.; HURWITZ, Julia L.. Respiratory Tract Epithelial Cells Express Retinaldehyde Dehydrogenase ALDH1A and Enhance IgA Production by Stimulated B Cells in the Presence of Vitamin A. **Plos One**, v. 9, n. 1, 22 jan. 2014.

RUSKIN, Joel; LARIVIERE, Marc. Low-dose co-trimoxazole for prevention of Pneumocystis carinii pneumonia in human immunodeficiency virus disease. *The Lancet*, [S.L.], v. 337, n. 8739, p. 468-471, fev. 1991.

SANTOS, Ed W; OLIVEIRA, Dalila C; SILVA, Graziela B; TSUJITA, Maristela; BELTRAN, Jackeline O; HASTREITER, Araceli; A FOCK, Ricardo; BORELLI, Primavera. Hematological alterations in protein malnutrition. **Nutrition Reviews**, v. 75, n. 11, p. 909-919, 6 set. 2017.

SAVINO, W. The thymus gland is a target in malnutrition. **European Journal Of Clinical Nutrition**, v. 56, n. 3, p. 46-49, 30 jul. 2002

SALAMEH; MOREL; ZEILANI; DÉCHELOTTE; MARION-LETELLIER. Animal Models of Undernutrition and Enteropathy as Tools for Assessment of Nutritional Intervention. **Nutrients**, v. 11, n. 9, 16 set. 2019.

SARAN, Shailee; GOPALAN, Sarath; KRISHNA, T. Prasanna. Use of fermented foods to combat stunting and failure to thrive. **Nutrition**, v. 18, n. 5, p. 393-396, maio 2002.

SASSI, Francesca; TAMONE, Cristina; D' AMELIO, Patrizia. Vitamin D: nutrient, hormone, and immunomodulator. **Nutrients**, v. 10, n. 11, nov. 2018.

SEEDORF, Henning; GRIFFIN, Nicholas W.; RIDAURA, Vanessa K.; REYES, Alejandro; CHENG, Jiye; REY, Federico E.; SMITH, Michelle I.; SIMON, Gabriel M.; SCHEFFRAHN, Rudolf H.; WOEBKEN, Dagmar. Bacteria from Diverse Habitats Colonize and Compete in the Mouse Gut. **Cell**, v. 159, n. 2, p. 253-266, out. 2014.

SEGATA, Nicola; IZARD, Jacques; WALDRON, Levi; GEVERS, Dirk; MIROPOLSKY, Larisa; GARRETT, Wendy s; HUTTENHOWER, Curtis. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, v. 12, n. 6, p. 1-2, 2011.

SEGATA, Nicola; HAAKE, Susan; MANNON, Peter; LEMON, Katherine P; WALDRON, Levi; GEVERS, Dirk; HUTTENHOWER, Curtis; IZARD, Jacques. Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. **Genome Biology**, v. 13, n. 6, 2012.

SCHROEDER, Bjoern O. Fight them or feed them: how the intestinal mucus layer manages the gut microbiota. **Gastroenterology Report**, v. 7, n. 1, p. 3-12, 1 fev. 2019.

SCHWARZER, Martin; MAKKI, Kassem; STORELLI, Gilles; MACHUCA-GAYET, Irma; SRUTKOVA, Dagmar; HERMANOVA, Petra; MARTINO, Maria E.; BALMAND, Severine; HUDCOVIC, Tomas; HEDDI, Abdelaziz; RIEUSSET, Jennifer; KOZAKOVA, Hana; VIDAL, Hubert; LEULIER, François. *Lactobacillus plantarum* strain maintains growth of infant mice during chronic undernutrition. **Science**, v. 351, n. 6275, p.854-857, 18 fev. 2016.

SYLVIA, Kristyn E.; JEWELL, Cathleen P.; RENDON, Nikki M.; JOHN, Emma A. St.; DEMAS, Gregory E.. Sex-specific modulation of the gut microbiome and behavior in Siberian hamsters. **Brain, Behavior, And Immunity**, v. 60, p. 51-62, fev. 2017.

SINGH, Nagendra; GURAV, Ashish; SIVAPRAKASAM, Sathish; BRADY, Evan; PADIA, Ravi; SHI, Huidong; THANGARAJU, Muthusamy; PRASAD, Puttur D.; MANICASSAMY, Santhakumar; MUNN, David H.. Activation of Gpr109a, Receptor for Niacin and the Commensal Metabolite Butyrate, Suppresses Colonic Inflammation and Carcinogenesis. **Immunity**, v. 40, n. 1, p. 128-139, jan. 2014.

SMITH, Michelle I.; YATSUNENKO, Tanya; MANARY, Mark J.; TREHAN, Indi; MKAKOSYA, Rajhab; CHENG, Jiye; KAU, Andrew L.; RICH, Stephen S.; CONCANNON, Patrick; MYCHALECKYJ, Josyf C.. Gut Microbiomes of Malawian Twin Pairs Discordant for Kwashiorkor. **Science**, v. 339, n. 6119, p. 548-554, 30 jan. 2013.

SON, Hee Jin; KIM, Nayoung; SONG, Chin-Hee; NAM, Ryoung Hee; CHOI, Soo In; KIM, Joo Sung; LEE, Dong Ho. Sex-related Alterations of Gut Microbiota in the C57BL/6 Mouse Model of Inflammatory Bowel Disease. **Journal Of Cancer Prevention**, v. 24, n. 3, p. 173-182, 30 set. 2019.

SONNTAG, William E.; LYNCH, Colleen; THORNTON, Phillip; KHAN, Amir; BENNETT, Sean; INGRAM, Rhonda. The effects of growth hormone and IGF-1 deficiency on cerebrovascular and brain ageing. **Journal Of Anatomy**, v. 197, n. 4, p. 575-585, nov. 2000.

STOKSTAD, E. L. R.; JUKES, T. H.. Further Observations on the "Animal Protein Factor". **Experimental Biology And Medicine**, v. 73, p. 523-528, 1 mar. 1950.

SUÁREZ-ZAMORANO, Nicolas; FABBIANO, Salvatore; CHEVALIER, Claire; STOJANOVIĆ, Ozren; COLIN, Didier J; STEVANOVIĆ, Ana; VEYRAT-DUREBEX, Christelle; TARALLO, Valentina; RIGO, Dorothée; GERMAIN, Stéphane. Microbiota depletion promotes browning of white adipose tissue and reduces obesity. **Nature Medicine**, v. 21, n. 12, p. 1497-1501, 16 nov. 2015.

SUBRAMANIAN, Sathish; HUQ, Sayeeda; YATSUNENKO, Tanya; HAQUE, Rashidul; MAHFUZ, Mustafa; ALAM, Mohammed A.; BENEZRA, Amber; DESTEFANO, Joseph; MEIER, Martin F.; MUEGGE, Brian D.. Persistent gut microbiota immaturity in malnourished Bangladeshi children. **Nature**, v. 510, n. 7505, p. 417-421, jun. 2014.

SULLIVAN, Åsa; EDLUND, Charlotta; NORD, Carl Erik. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 101-114, set. 2001.

SUN, Lili; JIA, Hongmei; LI, Jiaojiao; YU, Meng; YANG, Yong; TIAN, Dong; ZHANG, Hongwu; ZOU, Zhongmei. Cecal Gut Microbiota and Metabolites Might Contribute to the Severity of Acute Myocardial Ischemia by Impacting the Intestinal Permeability, Oxidative Stress, and Energy Metabolism. **Frontiers In Microbiology**, v. 10, 2 ago. 2019.

TANAKA, M.; SUGANAMI, T.; KIM-SAIJO, M.; TODA, C.; TSUIJI, M.; OCHI, K.; KAMEI, Y.; MINOKOSHI, Y.; OGAWA, Y. Role of Central Leptin Signaling in the Starvation-Induced Alteration of B-Cell Development. **Journal Of Neuroscience**, v. 31, n. 23, p. 8373-8380, 8 jun. 2011

TEODOSIO, Naide R.; LAGO, Eunice S.; ROMANI, Silvia A. M.; GUEDES, Rubem C. A. A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 40, n. 4, p. 533-552, 21 out. 1990.

THACKRAY, Larissa B.; HANDLEY, Scott A.; GORMAN, Matthew J.; PODDAR, Subhajt; BAGADIA, Prachi; BRISEÑO, Carlos G.; THEISEN, Derek J.; TAN, Qing; HYKES, Barry L.; LIN, Hueylie. Oral Antibiotic Treatment of Mice Exacerbates the Disease Severity of Multiple Flavivirus Infections. **Cell Reports**, v. 22, n. 13, mar. 2018.

TREHAN, Indi; GOLDBACH, Hayley S.; LAGRONE, Lacey N.; MEULI, Guthrie J.; WANG, Richard J.; MALETA, Kenneth M.; MANARY, Mark J.. Antibiotics as Part of the Management of Severe Acute Malnutrition. *New England Journal Of Medicine*, [S.L.], v. 368, n. 5, p. 425-435, 31 jan. 2013.

TROMPETTE, Aurélien; GOLLWITZER, Eva s; YADAVA, Koshika; SICHELSTIEL, Anke K; SPRENGER, Norbert; NGOM-BRU, Catherine; BLANCHARD, Carine; JUNT, Tobias; NICOD, Laurent P; HARRIS, Nicola L. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. **Nature Medicine**, v. 20, n. 2, p. 159-166, 5 jan. 2014.

THE JACKSON LABORATORY (Estados Unidos). **BODY WEIGHT INFORMATION FOR C57BL/6J (000664)**. Disponível em: <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/strain-data-sheet-pages/body-weight-chart-000664#>. Acesso em: 24 set. 2020.

UBEDA, Carles; TAUR, Ying; JENQ, Robert R.; EQUINDA, Michele J.; SON, Tammy; SAMSTEIN, Miriam; VIALE, Agnes; SOCCI, Nicholas D.; BRINK, Marcel R.M. van Den; KAMBOJ, Mini. Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 120, n. 12, p. 4332-4341, 1 dez. 2010.

UBEDA, Carles; PAMER, Eric G.. Antibiotics, microbiota, and immune defense. **Trends In Immunology**, v. 33, n. 9, p. 459-466, set. 2012.

UENO, Priscilla M.; ORIÁ, Reinaldo B.; MAIER, Elizabeth A.; GUEDES, Marjorie; AZEVEDO, Orleancio G. de; WU, David; WILLSON, Tara; HOGAN, Simon P.; LIMA, Aldo A. M.; GUERRANT, Richard L.. Alanyl-glutamine promotes intestinal epithelial cell homeostasis in vitro and in a murine model of weanling undernutrition. **American Journal Of Physiology-Gastrointestinal And Liver Physiology**, v. 301, n. 4, p. 612-622, out. 2011.

UNICEF (Brasil). **Desnutrição**. 2018. Disponível em: <<https://www.unicef.org/brazil/desnutricao>>. Acesso em: jan. 2020.

UNICEF, WHO, The World Bank Group: **Levels and Trends in Child Malnutrition** (brochure – key findings of the 2017 edition). 2017. Disponível em: <http://www.who.int/nutgrowthdb/jme_brochure2017.pdf?ua=1>. Acesso em jan. 2020.

VEMURI, Ravichandra; SYLVIA, Kristyn E.; KLEIN, Sabra L.; FORSTER, Samuel C.; PLEBANSKI, Magdalena; ERI, Raj; FLANAGAN, Katie L.. The microgenderome revealed: sex differences in bidirectional interactions between the microbiota, hormones, immunity and disease susceptibility. **Seminars In Immunopathology**, v. 41, n. 2, p. 265-275, 8 out. 2018.

VILADOMIU, Monica; KIVOLOWITZ, Charles; ABDULHAMID, Ahmed; DOGAN, Belgin; VICTORIO, Daniel; CASTELLANOS, Jim G.; WOO, Viola; TENG, Fei; TRAN, Nhan L.; SCZESNAK, Andrew. IgA-coated *E. coli* enriched in Crohn's disease spondyloarthritis promote TH17-dependent inflammation. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. 376, p. 1-2, 8 fev. 2017.

WAAIJ, L A van Der; LIMBURG, P C; MESANDER, G; WAAIJ, D van Der. In vivo IgA coating of anaerobic bacteria in human faeces. **Gut**, v. 38, n. 3, p. 348-354, 1 mar. 1996.

WALTER, Jens; LEY, Ruth. The Human Gut Microbiome: ecology and recent evolutionary changes. **Annual Review Of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 411-429, 13 out. 2011.

WANAGAT, J.; ALLISON, D. B.; WEINDRUCH, R.. Caloric intake and aging: mechanisms in rodents and a study in nonhuman primates. **Toxicological Sciences**, v. 52, n. 2, p. 35-40, 1 dez. 1999.

WANG, Shuo; HUANG, Meiqin; YOU, Xue; ZHAO, Jingyu; CHEN, Lanlan; WANG, Lin; LUO, Yangjun; CHEN, Yan. Gut microbiota mediates the anti-obesity effect of calorie restriction in mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 29 ago. 2018.

WANG, Xuexuan; VALENZANO, Mary Carmen; MERCADO, Joanna M.; ZURBACH, E. Peter; MULLIN, James M.. Zinc Supplementation Modifies Tight Junctions and Alters Barrier Function of CACO-2 Human Intestinal Epithelial Layers. **Digestive Diseases And Sciences**, v. 58, n. 1, p. 77-87, 19 ago. 2012.

WATERLOW, J. C; BUZINA, R; KELLER, W; LANE, J. M; NICHAMAN, M. Z; TANNER, J. M. The presentation and use of height and weight data for comparing nutritional status of groups of children under the age of 10 years. **Bulletin of the World Health Organization**, 1977

WEINDRUCH, Richard; SOHAL, Rajindar S.. Caloric Intake and Aging. **New England Journal Of Medicine**, v. 337, n. 14, p. 986-994, 2 out. 1997.

WHITCOMB, James P.; DEAGOSTINO, Mary; BALLENTINE, Mark; FU, Jun; TENNISWOOD, Martin; WELSH, Joellen; CANTORNA, Margherita; MCDOWELL, Mary Ann. The Role of Vitamin D and Vitamin D Receptor in Immunity to *Leishmania major* Infection. **Journal Of Parasitology Research**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

WHITE, John H.. Regulation of intracrine production of 1,25-dihydroxyvitamin D and its role in innate immune defense against infection. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, v. 523, n. 1, p. 58-63, jul. 2012.

WHO. Guideline: Updates on the management of severe acute malnutrition in infants and children. Geneva, World Health Organization; 2013. Disponível em:

<http://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/updates_management_SAM_

WHO. Management of severe malnutrition: a manual for physicians and other senior health care workers. Geneva: **World Health Organization**, 1999.

WHO. Pocketbook of hospital care for children: guidelines for the management of common illnesses with limited resources. Geneva: **World Health Organization**, 2005

WHO. The double burden of malnutrition. Policy brief. Geneva: World Health Organization; 2017.

WHO. **Growth reference 5-19 years**: weight-for-age (5-10 years). Weight-for-age (5-10 years). Disponível em: https://www.who.int/growthref/who2007_weight_for_age/en/. Acesso em: 28 set. 2020a.

WHO. World Health Organization. MALNUTRITION. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition>. Acesso em: 1 abr. 2020b.

WILLIAMS, C. D.. A nutritional disease of childhood associated with a maize diet. **Archives Of Disease In Childhood**, v. 8, n. 48, p.423-433, 1 dez 1933.

WIT, Nicole de; DERRIEN, Muriel; BOSCH-VERMEULEN, Hanneke; OOSTERINK, Els; KESHTKAR, Shohreh; DUVAL, Caroline; BOSCH, Johan de Vogel-Van Den; KLEEREBEZEM, Michiel; MÜLLER, Michael; MEER, Roelof van Der. Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine. **American Journal Of Physiology-Gastrointestinal And Liver Physiology**, v. 303, n. 5, p. 589-599, 1 set. 2012.

WOERTHER, P.-L.; ANGEBAULT, C.; JACQUIER, H.; HUGEDE, H.-C.; JANSSENS, A.-C.; SAYADI, S.; MNIAI, A. El; ARMAND-LEFEVRE, L.; RUPPE, E.; BARBIER, F.. Massive Increase, Spread, and Exchange of Extended Spectrum β -Lactamase-Encoding Genes Among Intestinal Enterobacteriaceae in Hospitalized Children With Severe Acute Malnutrition in Niger. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 7, p. 677-685, 2 set. 2011.

WOODWARD, Bill. Fidelity in Animal Modeling: prerequisite for a mechanistic research front relevant to the inflammatory incompetence of acute pediatric malnutrition. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 17, n. 4, p. 541, 11 abr. 2016.

WU, Pin-Pin; HSIEH, Yao-Peng; KOR, Chew-Teng; CHIU, Ping-Fang. Association between Albumin–Globulin Ratio and Mortality in Patients with Chronic Kidney Disease. **Journal Of Clinical Medicine**, v. 8, n. 11, 15 nov. 2019.

XIAO, Liang; FENG, Qiang; LIANG, Suisha; SONNE, Si Brask; XIA, Zhongkui; QIU, Xinmin; LI, Xiaoping; LONG, Hua; ZHANG, Jianfeng; ZHANG, Dongya. A catalog of the mouse gut metagenome. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 10, p. 1103-1108, 28 set. 2015.

YIMAGOU, Edmond Kuete; BAUDOIN, Jean-Pierre; ABDALLAH, Rita Abou; PINTO, Fabrizio di; KHALIL, Jacques Yaacoub Bou; RAOULT, Didier. Full-repertoire comparison of the microscopic objects composing the human gut microbiome with sequenced and cultured communities. **Journal Of Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 377-386, 11 abr. 2020.

YIN, Jia; M, Prabhakar; WANG, Shan; LIAO, Shuo-Xi; PENG, Xin; HE, Yan; CHEN, Yi-Ran;

SHEN, Hua-Fang; SU, Jin; CHEN, Ye. Different Dynamic Patterns of β -Lactams, Quinolones, Glycopeptides and Macrolides on Mouse Gut Microbial Diversity. **Plos One**, v. 10, n. 5, 13 maio 2015.

YOSHIYA, Kazuhisa; LAPCHAK, Peter H.; THAI, To-Ha; KANNAN, Lakshmi; RANI, Poonam; LUCCA, Jurandir J. Dalle; TSOKOS, George C.. Depletion of gut commensal bacteria attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury. **American Journal Of Physiology-Gastrointestinal And Liver Physiology**, v. 301, n. 6, dez. 2011.

ZHANG, Dachuan; CHEN, Grace; MANWANI, Deepa; MORTHA, Arthur; XU, Chunliang; FAITH, Jeremiah J.; BURK, Robert D.; KUNISAKI, Yuya; JANG, Jung-Eun; SCHEIERMANN, Christoph. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. **Nature**, v. 525, n. 7570, p. 528-532, set. 2015

ZHONG, Wei; ZHAO, Yantao; SUN, Xinguo; SONG, Zhenyuan; MCCLAIN, Craig J.; ZHOU, Zhanxiang. Dietary Zinc Deficiency Exaggerates Ethanol-Induced Liver Injury in Mice: involvement of intrahepatic and extrahepatic factors. **Plos One**, v. 8, n. 10, 14 out. 2013.