

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Rafaela Alves Arcanjo

**EFEITO DO TEMPO DE UTILIZAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS PRESCRITOS  
PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES COMUNITÁRIAS NO  
COMPORTAMENTO E NO MICROBIOMA INTESTINAL – ESTUDO EM  
MODELO ANIMAL**

Porto Alegre

2021

Rafaela Alves Arcanjo

**EFEITO DO TEMPO DE UTILIZAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS  
PRESCRITOS PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES COMUNITÁRIAS  
NO COMPORTAMENTO E NO MICROBIOMA INTESTINAL – ESTUDO EM  
MODELO ANIMAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas Farmacologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Montagner

Porto Alegre

2021

### CIP - Catalogação na Publicação

Arcanjo, Rafaela Alves

EFEITO DO TEMPO DE UTILIZAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS  
PRESCRITOS PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES COMUNITARIAS  
NO COMPORTAMENTO E NO MICROBIOMA INTESTINAL - ESTUDO  
EM MODELO ANIMAL / Rafaela Alves Arcanjo. -- 2021.  
73 f.

Orientador: Francisco Montagner.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Antibiótico. 2. Microbioma intestinal. 3.  
Sequenciamento. 4. Memória de reconhecimento. 5.  
Ansiedade. I. Montagner, Francisco, orient. II.  
Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

### **Prof. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**

Professora Titular da Área de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Campinas (FOP- UNICAMP)

### **Prof. Dr. Eduardo Rigon Zimmer**

Professor Adjunto no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

### **Prof. Dra. Maria Paz Loayza Hidalgo**

Professora Associada do Departamento de Psiquiatria e Medicina Legal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

*Dedico este trabalho ao meu companheiro Rogério,  
por não me deixar desistir aos “nãos” que a vida nos  
apresenta, por me acompanhar, por me ensinar a  
sorrir mesmo quando eu não tinha forças. Pelo amor,  
apoio, motivação e sobretudo paciência!*

*A minha filha Alice, que traz luz para minha vida.  
Você é a lição mais profunda de dignidade e amor!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Agradeço aos meus pais, que sempre me motivaram, entenderam as minhas faltas e momentos de afastamento e reclusão e me mostraram o quanto era importante estudar, mesmo não tendo eles a mesma oportunidade no passado. A minha mãe minha eterna gratidão, por largar tudo, sair do interior, encarar um aeroporto sozinha e passar incansáveis dias numa cadeira de hospital ao meu lado e da Alice (ainda na barriga), faltam palavras que possam expressar a minha gratidão!

À minha tia Penha, que por algumas vezes largou tudo e foi até Porto Alegre para cuidar da Alice, enquanto eu me dedicava ao doutorado.

Agradeço aos meus irmãos Ana Cláudia e Fernando pelo companheirismo, preocupação, amizade e amor.

Ao meu orientador Prof.<sup>a</sup> Dr. Francisco Montagner, obrigada pela sua generosidade em dividir conosco seu conhecimento, sua ética e sua humildade e por todos os anos em que estivemos juntos pesquisando, refletindo e compartilhando. Aprendi contigo que o espaço acadêmico é um local de envolvimento teórico e pessoal e de que nada adianta um saber se ele não está a serviço da sociedade. Obrigada por fazer a diferença e por possibilitar que façamos também.

As minhas amigas Dami e Rita, que mesmo distantes estão sempre presentes em minha vida!

Agradeço ao Rodrigo Bracini, pela ajuda com a manipulação e os testes nos animais, por ter compartilhado comigo seus ensinamentos e importantes conhecimentos.

À professora Dr. Maria Martha, por ter aceitado participar desse trabalho, por nos ter acolhido, comprado nossa ideia e ceder seu espaço. Obrigada!

Aos meus sogros João e Nancy, que sempre nos incentivaram e sempre que podiam estavam perto de nós.

Um agradecimento afetivo fica reservado, ao meu cão Luke, pela fidelidade de um grande amigo.

Aos professores, professoras e alunos da Faculdade de Odontologia da UFRGS, por me receberem sem julgamentos e apoiarem o meu trabalho. Em especial ao professor Régis pelas conversas e palavras de incentivo.

Aos companheiros e companheiras de trabalho da SRS/Ponte Nova, em especial ao Luiz, pelos ensinamentos diários no trabalho e a amiga Edilaine pela forma carinhosa e generosa com que me recebeu e continua me amparando e pelo estímulo diário.

Aos funcionários do Centro de Modelos Biológicos Experimentais - PUCRS pelo acolhimento que me deram.

Aos funcionários e alunos do LABIM Laboratório de Bioquímica e Microbiologia, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por dividirem o espaço do laboratório e por me fazerem companhia nos incansáveis dias passados no mesmo.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul pela parceria, por permitir parte da execução deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) por fornecer suporte financeiro para a realização do presente estudo, por meio de bolsa de doutorado e também por meio do Edital Pesquisado Gaúcho 2019, Processo FAPERGS número 88887.160945/2017-00.

*Nada define a nossa natureza como  
criaturas vivas mais dramaticamente do  
que a nossa ingestão.*  
Sidney Mintz



## RESUMO

O cérebro e o intestino comunicam de forma dinâmica e complexa através de diferentes vias, formando um eixo bidirecional, cujo equilíbrio depende da composição da comunidade microbiana que habita o intestino. Estudos tem revelado que a microbiota intestinal influencia o normal funcionamento do cérebro e o comportamento, através da via neural, endócrina ou imunitária. Desta forma, a comunidade bacteriana comensal presente no intestino é responsável por regular as respostas ao stress, tendo-se demonstrado que modificações na composição da microbiota se encontram associadas ao desenvolvimento de ansiedade, depressão e prejuízos na memória. A exposição a antimicrobianos pode causar alterações na composição do microbioma intestinal, dependendo do antibiótico utilizado, da dose e do tempo de exposição. O impacto causado pela exposição a esses medicamentos rotineiramente utilizados em infecções comunitárias ainda é pouco conhecido. Nesse contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do uso de amoxicilina e clindamicina na diversidade e na estrutura da microbiota intestinal, além das possíveis alterações de comportamento em animais. Ratos Wistar machos (N = 42, 8 semanas de idade) foram alocados por randomização simples em quatro grupos experimentais principais: dois controles, dois grupos de teste e um Naive Group. Os animais foram tratados, por gavagem, com amoxicilina e clindamicina (25 mg/kg) de 12/12 por 3 e 7 dias. Foram coletadas as fezes dos animais, após 3,7,30,60 e 90 dias do tratamento, para avaliar o aumento ou diminuição das colônias, utilizando-se o método de cultura bacteriana, foi realizado o sequenciamento para identificar e diferenciar as cepas. Os animais foram avaliados no Teste de Campo Aberto e Labirinto em cruz elevado como medida de ansiedade. Para avaliação da memória foi realizado o Teste de Reconhecimento de Objetos. Após a administração de qualquer um dos antibióticos por 3 e 7 dias, houve uma mudança estatisticamente significativa na carga bacteriana, com aumento nos filos Bacterioidetes e Proteobacteria. Os animais tratados com antibióticos exibiram alterações de memória de reconhecimento reduzidas, acompanhadas por um efeito ansiogênico que permaneceu significativo por 30 dias em ratos que haviam sido tratados com antibióticos por 7 dias. Os resultados do presente estudo sugerem que mudanças na composição do microbioma intestinal pela administração de antibióticos podem levar à modulação cognitiva e comportamental em ratos quando amoxicilina e clindamicina são empregadas em esquemas posológicos para tratamento de infecções comunitárias.

Palavras-chave: Antibiótico, Microbioma intestinal, Sequenciamento, Memória de reconhecimento, Ansiedade.

## ABSTRACT

The brain and the intestine communicate dynamically and complexly through different routes, forming a bidirectional axis, whose balance depends on the microbial community's composition that inhabits the intestine. Studies have revealed that the intestinal microbiota influences the brain's normal functioning and behavior through the neural, endocrine, or immune pathways. In this way, the commensal bacterial community present in the intestine is responsible for regulating responses to stress. It has been shown that changes in the microbiota's composition are associated with anxiety, depression, and impaired memory. Exposure to antimicrobials can cause changes in the intestinal microbiome's composition, depending on the antibiotic used, the dose, and the time of exposure. The impact of exposure to these drugs routinely used in community infections is still poorly understood. The present study aimed to evaluate the effect of amoxicillin and clindamycin on the diversity and structure of the intestinal microbiota and behavioral changes in animals. Male Wistar rats (N = 42, 8 weeks old) were allocated by simple randomization into four main experimental groups: two controls, two test groups, and one Naive Group. The animals were treated, by gavage, with amoxicillin and clindamycin (25 mg/kg) of 12/12 for 3 and 7 days. The feces were collected after 3, 7, 30, 60, and 90 days of treatment through culturing and sequencing. The animals were evaluated in the Open Field Test and elevated plus-maze as a measure of anxiety. To assess memory, the Object Recognition Test was performed. After administering any of the antibiotics for 3 and 7 days, there was a statistically significant change in the bacterial load, with an increase in the phyla Bacteroidetes and Proteobacteria. The antibiotic-treated groups exhibited reduced recognition memory changes, accompanied by an anxiogenic effect that remained significant for 30 days in rats that had been treated with antibiotics for 7 days. Data suggested antibiotics changed the intestinal microbiome composition by antibiotics, leading to cognitive and behavioral modulation in rats.

Keywords: Antibiotic, Gut Microbiome, Next Generation Sequencing, Recognition memory, Anxiety.

## LISTA DE ABREVIATURAS

OMS - Organização Mundial da Saúde

IRAS - Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde

SCFAs - Ácidos Graxos de Cadeia Curta

CDI - Infecção por *C. difficile*

SNC - Sistema Nervoso Central

SNE - Sistema Nervoso Entérico

SNA - Sistema Nervoso Autônomo

GM - *germ free*

HPA - Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

CT - *Group Control*

OTU - *Total of Bacterial Taxa*

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
2.1 Microbioma intestinal e sua composição.....	16
2.2 Uso de Antibióticos e alterações no microbioma.....	18
2.3 Eixo cérebro-intestino.....	21
2.4 Uso de antibióticos, alterações no microbioma e no comportamento.....	24
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>4. ARTIGO.....</b>	<b>28</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>62</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>63</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>69</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Desde a descoberta da Penicilina por Alexander Fleming em 1928 (Fleming 1929), muitos antibióticos foram desenvolvidos pela indústria farmacêutica. Assim, muitos avanços e pesquisas relacionadas puderam promover a solução de muitas doenças infecciosas, antes incuráveis (Zoorob et al. 2012).

O uso clínico de antibióticos foi, indiscutivelmente, o maior avanço médico do século XX (Katz and Baltz 2016). Além de serem utilizados para tratamento de doenças infecciosas, os antibióticos possibilitaram que muitos procedimentos médicos modernos, incluindo tratamento de câncer e transplantes de órgãos fossem realizados de forma mais segura (Katz and Baltz 2016).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), amoxicilina é o antibiótico usado com mais frequência em todo o mundo. Um relatório realizado em 49 países, concluiu que esse medicamento representa mais de 50% dos antibacterianos consumidos, sendo utilizado no tratamento de infecções do trato respiratório, infecções do ouvido médio, pneumonia, infecções do trato urinário, infecções de pele e infecções odontogênicas (WHO 2018).

A OMS adverte que para o uso racional de antibióticos, é necessário, em primeiro lugar, instituir a necessidade do uso do medicamento. Em seguida, que seja escolhido o medicamento apropriado, de acordo com critérios de eficácia e segurança comprovados e aceitáveis. Além disso, é preciso que o medicamento seja prescrito na forma farmacêutica, doses e períodos de tratamento adequados, que esteja disponível na ocasião oportuna, com um valor acessível e que esteja sempre dentro dos padrões de qualidade exigidos. Outro aspecto importante é que os medicamentos sejam dispensados em condições adequadas, com a necessária orientação e responsabilidade e, por fim, que se cumpra o regime terapêutico prescrito da melhor forma possível. (WHO 2018).

O uso de antimicrobianos se presta para o tratamento de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e infecções comunitárias. As IRAS são definidas como aquelas adquiridas após a admissão do paciente com manifestação durante a internação ou após a alta quando relacionadas a internações ou procedimentos realizados durante a assistência. Entretanto, não é restrito exclusivamente ao ambiente

hospitalar e se refere ao fato de que as IRAS podem ocorrer em vários níveis de atenção à saúde (Siegel et al. 2007). Entretanto as infecções comunitárias são aquelas averiguadas ou em incubação de pacientes na comunidade em que não há relação com o ingresso do paciente no hospital e desde que a mesma não esteja relacionada a uma internação anterior (Ministério da Saúde 1998).

Os tipos de infecções comunitárias observados com maior frequência são infecções respiratórias, infecções do trato urinário e infecções cutâneas (Falsey et al. 2014). Sendo as infecções respiratórias mais prevalentes as amigdalites, bronquites e as pneumonias. Ressalta-se que a prescrição de antibiótico geralmente ocorre em 95.5% dos casos (Schaad et al. 2016).

Da mesma forma que nas infecções do trato respiratório superior o uso de antibióticos, de administração oral, em infecções adquiridas na comunidade, também é empregado na prática em clínica odontológica (Segura-Egea et al. 2010). Neste contexto há que se considerar também as infecções odontogênicas, aquelas que se iniciam a partir de estruturas dentais. Elas podem ser provenientes de cáries que causam necrose pulpar e se disseminam para o tecido ósseo periapical ou periodontal, decorrentes de infecção bacteriana de uma bolsa periodontal ou de um folículo pericoronário de um dente parcialmente erupcionado (Bascones et al. 2004).

A amoxicilina é o antibacteriano de primeira escolha (Segura-Egea et al. 2017). Em casos de relato de alergia a betalactâmicos, as alternativas são usar como terapias para substituição a clindamicina, a claritromicina ou a azitromicina (Segura-Egea et al. 2017).

Entretanto, a inegável relação entre a constituição da microbiota intestinal e suas alterações têm sido intensamente estudada nos últimos anos (Passos and Moraes-Filho 2017). Está claro que as interações entre hospedeiros e suas comunidades microbianas precisam ser caracterizadas em detalhes se quisermos entender a sua participação nos processos fisiológicos humanos. Além disso, é provável que o estudo de tais interações hospedeiro-microrganismo forneça novas estratégias para modular tais sistemas complexos com o intuito de manter ou restaurar a homeostase, a fim de prevenir ou curar estados patológicos. Há crescentes indícios da importância das bactérias na formação do desenvolvimento do cérebro e do comportamento (Cho and Blaser 2012, Sharon et al. 2016). As modificações nas comunidades microbianas intestinais podem afetar a comunicação intestinal, alterando a trajetória do

desenvolvimento do cérebro e a crescente vulnerabilidade aos transtornos psiquiátricos (Guarner and Malagelada 2003, Dinan and Cryan 2013, Sharon et al. 2016).

Partindo do pressuposto de que o uso de antimicrobiano seria inapropriado em muitos casos, pois estima-se que 70-80% das receitas de antimicrobianos para infecções do trato respiratório superior seriam para infecções predominante de etiologia viral (Tonkin-Crine et al. 2016) e o adequado tratamento nos casos de infecções endodônticas agudas, limitado a tratamento local, com debridamento do espaço do canal radicular e uso de analgésicos seria suficiente para reduzir a carga microbiana e permitir a cura (Khalighinejad et al. 2016), as mudanças na microbiota intestinal poderiam promover impacto na diversidade bacteriana, na expressão de seus fatores de virulência (resistência aos antimicrobianos), nos comportamentos como a ansiedade. O uso de antibióticos e sua real necessidade devem ser avaliados, pois prescrever antibióticos em situações em que não seriam indicados é um risco tanto para o aumento da resistência bacteriana quanto para mudanças significativas na microbiota e como consequência há evidências de mudanças na microbiota intestinal e seus efeitos em estruturais neurais (Zhang et al. 2015).

Esse estudo pretende contribuir para detecção de perfis de microbiota diferentes em ratos que após o uso de antibióticos possam ter uma possível relação de mudança no comportamento relacionado à ansiedade e à alteração de memória durante o tratamento e após meses do uso de antibióticos, auxiliando os profissionais na concepção de novas estratégias terapêuticas, no uso consciente de antibióticos.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Microbioma intestinal e sua composição

O microbioma humano é a soma de todos microorganismos que residem nos tecidos e fluidos humanos, composto principalmente por bactérias. A microbiota humana normal também inclui alguns fungos, arqueias e vírus. Cada local anatômico (pele, boca, intestino, vagina, etc) possui seu microbioma específico (Marchesi and Ravel 2015). Wunsche et al. (1995) consideram as comunidades microbianas como unidades funcionais nos ecossistemas, as quais são caracterizadas pela soma das capacidades metabólicas das diferentes espécies.

O trato gastrointestinal humano contém mais de 100 bilhões microrganismos, sendo que a grande maioria se encontra no intestino, superando inclusive o número de células humanas. Esta complexa comunidade microbiana é conhecida como a microbiota intestinal. Estima-se que a microbiota intestinal seja composta por 500 a 1.000 espécies residentes que incluem 7.000 a 40.000 cepas bacterianas representando 1800 gêneros (Hollister et al. 2014). A composição da microbiota, além da localização, é influenciado pela idade, sexo, raça e outros fatores como dieta, medicação (especialmente antibióticos), estresse, tabagismo ou infecções gastrointestinais (Guarner and Malagelada 2003). A microbiota intestinal coletivamente tem 150 vezes mais genes do que o genoma humano (Gill et al. 2006, Qin et al. 2010).

O “patrimônio genético” relacionado a essa comunidade é bastante complexo e específico, o que levou os pesquisadores a batizá-lo com o termo “Metagenoma” (Cho and Blaser 2012).

O perfil dos grupos de bactérias que compõem o microbioma residente em diversos locais anatômicos obedece a uma distribuição previsível entre as espécies de mamíferos, de acordo com cada parte do corpo colonizada. O trato gastrointestinal, incluindo a cavidade bucal e as fezes, são os microbiomas mais diversos entre os habitats corporais amostrados (Li et al. 2012).

O trato gastrointestinal superior, ou seja, o estômago e o intestino delgado, contêm poucas bactérias aderidas ao epitélio devido ao lúmen conter ácidos, secreções biliares e pancreáticas que exterminam a maioria dos microrganismos, além de movimentos propulsivos. No entanto, mesmo sob estas condições, um pequeno número



de bactérias (menos  $10^3/g$ ) está ligada ao epitélio gástrico,  $10^4$  estão presentes no jejuno e  $10^7-10^9/g$  estão presentes no íleo (Tlaskalová-Hogenová et al. 2011). Por outro lado, o intestino grosso contém um ecossistema microbiano diversificado com alta densidade de bactérias ( $10^{11}-10^{12}/g$ ) com maior frequência de bactérias anaeróbias (Ley et al. 2008).

Após o nascimento, do ponto de vista microbiológico, inicia-se a formação do microbioma intestinal (Fouhy 2012). O trato intestinal se desenvolve de um meio estéril para um microbioma estável, semelhante ao de um adulto aos dois anos de idade (Fouhy 2012). O desenvolvimento desse ecossistema é regulado por vários fatores, incluindo modo de parto, regime alimentar, dieta/peso materno, uso de probiótico e de pré-bióticos e exposição a antibióticos pré, peri e pós-natal (Fouhy 2012).

Entretanto, apesar de os filos que constituem o microbioma intestinal serem previsíveis, as espécies que a compõem diferem marcadamente de indivíduo para indivíduo, mesmo dentro de uma população saudável. O microbioma intestinal apresenta alta variabilidade interpessoal, fazendo com que cada pessoa apresente um perfil de microbioma praticamente único (Zaura et al. 2009). Os motivos que levam pessoas saudáveis a portarem perfis tão diferentes e específicos de microbioma ainda não são totalmente conhecidos, embora fatores como dieta, ambiente, tipo de parto, genética do hospedeiro e fatores relacionados à exposição precoce aos microbiontes exerçam influência definitiva nesta formação, em adultos, 98% de todas as espécies pertencem a quatro filos bacterianos: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria. (Cho and Blaser 2012, Peterson et al. 2009). No intestino humano, por exemplo, os filos mais comumente encontrados são: Bacteroidetes e Firmicutes (Morgan et al. 2013), os gêneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Ruminococcus* são predominantes.

Mudanças naturais na população bacteriana intestinal ocorrem durante o envelhecimento, devido à redução ou alteração em muitos processos fisiológicos e mudanças no estilo de vida, principalmente dieta, metabolismo, homeostase energética e imunidade (Kundu et al. 2017). Em um estudo conduzido por Binyamin et al. (2020) foi observado que grupo de idosos, que utilizam dieta rica em gordura, há uma alta proporção de Bacteroidetes e diminuição de Firmicutes.

Para uma melhor compreensão da composição e alterações do microbioma intestinal humano e sua influência potencial na saúde, estudos tem sido conduzidos com

modelos animais (Franzosa et al. 2019, Mondot et al. 2016). Roedores estão entre os animais de laboratório mais frequentemente empregados em diversos campos das ciências da vida, incluindo para o estudo do microbioma, por causa de suas semelhanças fisiológicas para com os humanos, bem como semelhanças em relação à anatomia gastrointestinal. Brooks et al. (2003), relataram que o microbioma intestinal de ratos abrigava de 338 OTUs ou filotipos, o que representa uma biodiversidade semelhante à do humano. Apenas 44 OTUs foram caracterizadas e pertenciam ao filo Firmicutes, e o restante era Bacteroidetes, com predomínio da família *Clostridium* e de lactobacilos (aproximadamente 20%), sendo os mais comuns *L. murinus* e *L. gasseri*.

## 2.2. Uso de Antibióticos e alterações no microbioma

Antimicrobianos classificam-se em antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoários, anti-helmínticos e antivirais. Antibacterianos são divididos em antibióticos, sintetizados por fungos e quimioterápicos, produzidos em laboratório. Os antibióticos são frequentemente manipulados quimicamente (semissintéticos). Geralmente, são pouco tóxicos para as células humanas, uma vez que são produzidos para a destruição ou inibição de uma célula microbiana, como elemento de defesa das bactérias e fungos (Fuchs et al. 2004).

Os antibióticos Betalactâmicos são uma classe ampla de antibióticos, que inclui a penicilina, cefalosporinas, cefamicinas, carbonêmicos, monobactâmicos, que possuem o núcleo  $\beta$ -lactâmico em sua estrutura molecular (Guimarães et al. 2010). São medicamentos indicados para tratamento de infecções causadas por cocos Gram-positivos e a maioria tem excreção pela via renal. Poucos são os betalactâmicos que não são eliminados por esta via, tendo como alternativa a excreção biliar. São exemplos destes, a cefoperazona e a ceftriaxona (Suarez and Gudiol 2009).

As lincosamidas, são uma classe de antibióticos que inclui a lincomicina, a clindamicina e a pirlimicina São antibióticos principalmente excretados pela bile o que gera altas concentrações nas fezes. Apresentam alta atividade frente a anaeróbios estritos. Rashid et al (2015) indicaram que o uso desse antimicrobiano produz redução de bactérias aeróbias e anaeróbias Gram-positivas, quando administrados por período prolongado a indivíduos saudáveis.

Pesquisas tem descrito que distúrbios no microbioma intestinal podem afetar o estado de saúde do hospedeiro. A disbiose intestinal, estado no qual o microbioma produz efeitos nocivos através de mudanças qualitativas e quantitativas da flora bacteriana intestinal (Hawrelak and Myers 2004), pode resultar em obesidade, diabetes, distúrbios gastrointestinais, imunológicos e neurocomportamentais. Tais doenças podem se originar devido a mudanças no microbioma, favorecendo espécies mais patogênicas que podem produzir vários fatores de virulência (Sweeney and Morton 2013, Astbury et al. 2015, Coppo 2018).

A capacidade dos antimicrobianos de alterar as comunidades microbiomas do intestino tem sido observada desde 1940, quando os antimicrobianos foram desenvolvidos e comercializados (Yoon and Yoon 2018). Em 1950, observou-se que o antibiótico terramicina interferiu drasticamente com o intestino microbiota de pacientes submetidos à cirurgia intestinal (Di Caprio and Rantz 1950). Desde então, muitos estudos tentaram elucidar as mudanças na microbiota causada pela administração de antibióticos. Alguns desses estudos sugerem que os antibióticos podem causar alterações transitórias (Palleja et al. 2018), mas outro estudo indica que eles podem levar a modificações permanentes. (Dethlefsen and Relman 2011). Esses fatores podem ser correlacionados, principalmente com o espectro de antibióticos, tempo de exposição, dosagem, e propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas também como vias de administração (Jernberg et al. 2010).

Estudos tem mostrado que intervenções antimicrobianas em neonatos e em crianças foram associadas à asma, redução da diversidade bacteriana e aumento de bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) (Murk et al. 2011, Lapin et al. 2015), às alergias, relacionadas a diminuição da prevalência ou abundância de *Bifidobacterium* ou *Bacteroides*, (Kim et al. 2019), às doenças metabólicas, aumento da atividade de lipase de lipoproteína causando maior absorção de ácidos graxos e acúmulo de triglicerídeos (Cox et al. 2014). As alterações na adiposidade infantil podem estar relacionadas à maior abundância na família *Lachnospiraceae* (maior peso infantil) e menor abundância de *Akkermansia muciniphila* (bactéria associada à saúde metabólica) (Zhang et al. 2019).

Dethlefsen and Relman (2011) avaliaram a microbiota intestinal de pessoas saudáveis que foram expostos à ciprofloxacina por 5 dias, 500 mg por via oral duas vezes ao dia, que ocorreram em 2 e 8 meses, os resultados mostraram que o antibiótico

alterou a diversidade e composição da microbiota, no entanto, as mudanças variaram entre os indivíduos.

Palleja et al. (2018) avaliaram amostras fecais de pacientes saudáveis que receberam, ao longo de 4 dias, uma vez ao dia, 500mg de meropenem, 500mg de vancomicina e 40mg de gentamicina. Alterações iniciais no microbioma fecal estiveram associadas à presença intensa de *Enterococcus faecalis* e *Fusobacterium nucleatum*, e o redução de espécies de *Bifidobacterium*. A microbiota intestinal dos indivíduos recuperou-se para a composição próxima da linha de base em 1,5 meses. Embora 9 estavam presentes em todos os indivíduos antes do tratamento, estas não foram detectadas em até 180 dias.

O desequilíbrio causado por antibióticos na microbiota intestinal pode também causar diarreia, associada principalmente à proliferação de *Clostridium difficile* (Silverman et al. 2017). Além disso, o tratamento com alguns antibióticos pode ser considerado um fator de risco para o desenvolvimento de infecção por *C. difficile* (CDI), principalmente clindamicina, cefalosporinas e fluoroquinolonas (Brown et al. 2013).

As lincosamidas (clindamicina) estão correlacionadas com o aumento de genes de resistência na microbiota intestinal e diminuição na diversidade de gêneros *Bacteroides* sp., *Coprococcus*, *Roseburia*, *Ruminococcus* e *Lachnospiraceae* (Rashid et al. 2015). Betalactâmicos (por exemplo, penicilina v, amoxicilina, ampicilina / sulbactam, cefalosporinas) parecem diminuir a riqueza bacteriana total de Actinobacteria e Firmicutes e aumento de Proteobacteria e Bacteroidetes (Arboleya et al. 2016). Macrolídeos (por exemplo, claritromicina e eritromicina) são correlacionados com diminuição de Actinobacteria (incluindo *Bifidobacterium*), Firmicutes (principalmente *Lactobacilli*) e diversidade bacteriana total e aumento de Proteobacteria e Bacteroidetes (Isanaka et al. 2016). Assim, a maioria dos antibióticos estão relacionados a uma das causas da disbiose, caracterizada neste caso foi a perda de diversidade, aumento na proporção de potencialmente bactérias patogênicas e desequilíbrio na proporção de filos bacterianos (Arboleya et al. 2016, Isanaka et al. 2016, Jakobsson et al. 2010).

Mudanças no ambiente local também constituem um fator envolvido na promoção de homeostase após disbiose, por exemplo, diarreia, onde a eliminação de

microorganismos indesejados ocorre, permitindo recolonização por bactérias nativas (Gordon et al. 2012).

Portanto, é possível considerar que o uso de antibióticos, possa gerar disbiose, em geral, através do aumento de Proteobacteria (Arboleya et al. 2016, Jakobsson et al. 2010) além de reduzir a proporção de bactérias benéficas e protetoras para o hospedeiro, incluindo Actinobacteria e Bacteroidetes (Jakobsson et al. 2010).

### 2.3. Eixo cérebro-intestino

O Eixo Cérebro-intestino é o conjunto de complexas vias neurais e gânglios, envolvendo o Sistema Nervoso Central (SNC), o Sistema Nervoso Entérico (SNE) e o Sistema Nervoso Autônomo (SNA). Além das vias neurais aferentes e eferentes, participam dele o sistema imune e o endócrino para a comunicação intercelular (O'Hara and Shanahan 2006). Por meio desse eixo, há integração de importantes centros cerebrais de controle cognitivo e emocional com os gânglios do SNE, possibilitando ampla regulação de vários mecanismos corporais, como sinalização intercelular, ativação imunológica, permeabilidade intestinal e sinalização neuroendócrina (El Aidy et al. 2015). O cérebro controla as funções intestinais como a motilidade intestinal, secreção, permeabilidade e produção de mucina, e, inversamente, mensagens viscerais do intestino podem influenciar as funções cerebrais e o comportamento (Collins 2012, Indrio 2013).

Estudos utilizando modelos animais e estratégias como infecções gastrointestinais experimentais, transplante de microbioma fecal e utilização de modelos isentos de colonização intestinal (modelos “*germ-free*”) vêm demonstrando que a íntima relação do microbioma com o SNE influencia de modo definitivo o funcionamento do Eixo Cérebro-Intestino. Tem sido demonstrado, por exemplo, que a colonização intestinal com certos tipos específicos de bactérias em modelos *germ free* (GM) foi capaz de modificar o comportamento frente à resposta ao stress. A partir de tais observações, surgem novas possibilidades de pesquisa sobre a influência do microbioma no neurodesenvolvimento, no comportamento, na cognição e na resposta orgânica ao stress (Collins et al. 2014, Dinan and Cryan 2013).

Um estudo conduzido por Kundu et al. (2019) investigou os efeitos das mudanças no microbioma decorrentes do envelhecimento, através do transplante do

microbioma intestinal de camundongos velhos ou jovens em camundongos receptores jovens GM. Ambos os grupos mostraram ganho de peso e massa muscular esquelética semelhantes. Camundongos GM que receberam um transplante de microbiota intestinal de camundongos doadores idosos mostraram aumento da neurogênese no hipocampo do cérebro. Os autores sugeriram que os transplantes do microbioma intestinal de hospedeiros idosos conferiram efeitos benéficos em receptores jovens.

O microbioma intestinal mantém a homeostase do sistema nervoso central, regulando a função imunológica e a integridade da barreira hematoencefálica. Os mecanismos exatos pelos quais ocorre a comunicação microbioma-intestino-cérebro ainda são amplamente desconhecidos. É provável que vários sistemas estejam simultaneamente envolvidos. Há evidências de que o microbioma intestinal pode influenciar os sistemas de sinalização neurotransmissor, sináptico, neurotrófico e a neurogênese (Luczynski et al. 2016, Yano et al. 2015).

Os mecanismos reguladores de duas vias no eixo cérebro-intestino sugerem que o cérebro e o intestino exercem efeitos significativos um sobre o outro. Por um lado, o centro SNC regula a microbiota intestinal direta e indiretamente (Sherwin et al. 2016). O cérebro regula diretamente a fisiologia intestinal por meio do sistema nervoso autônomo e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). O SNC regula indiretamente a composição e função do microrganismos intestinais ao liberar moléculas de sinalização, como citocinas, que podem influenciar o metabolismo de vários neurotransmissores, como a serotonina, a dopamina e o glutamato, e que possuem um papel importante sobre a plasticidade neuronal. É possível ainda que o microbioma intestinal também exerça efeitos sobre a função do SNC (Haroon et al. 2012).

As conexões neurais envolvem o sistema nervoso central autônomo e sistema entérico. O eixo intestinal do cérebro é comparável a um circuito complexo composto de receptores, fibras aferentes que se projetam para diferentes centros integrativos no cérebro e fibras eferentes projetando-se para o órgão efector (Gaman and Kuo 2008). Os receptores coletam sinais específicos do lumen, incluindo produtos químicos, mecânicos, térmica e dor, de forma indireta envolvendo algumas células como a células enteroendócrinas (Gaman and Kuo 2008, Mayer 2011). Células estas que sintetizam o neurotransmissor glutamato, utilizando esse como sinal sensorial aos neurônios vagais, o circuito neural que eles formam dá o intestino a rapidez para dizer ao cérebro de todas as ocorrências do dia (Kaelberer et al. 2018).

A entrada do sistema autônomo do intestino está conectada ao sistema límbico que é composto pelo hipocampo, que é responsável pela memória e navegação espacial, a amígdala que integra respostas de medo e excitação e o córtex límbico que regula o olfato e sensorial e funções motoras. Esta comunicação explica a forte ligação entre comportamento e intestino (Colins 2012). O SNE é um órgão semi-autônomo, ou seja, pode funcionar de forma independente e também está conectado ao cérebro. O ramo aferente do SNE carrega informação do intestino para o cérebro como uma resposta à distensão do intestino ou outros sinais perigosos, como endotoxinas bacterianas, citocinas, etc (Collins 2012).

As bactérias intestinais interagem com as células da mucosa através da liberação de substâncias bacterianas, produtos de fermentação, como SCFA, e indiretamente estimulando a produção no intestino de fatores neuroendócrinos (Indrio 2013). Eles produzem ou estimulam a produção de aminoácidos, como GABA e triptofano (precursor de serotonina), e monoaminas, como histamina e dopamina, que afeta tanto o SNE quanto o SNC (Stilling 2014).

As bactérias intestinais interagem diretamente com as células da mucosa por meio da liberação de substâncias bacterianas, produtos de fermentação, como SCFAs, e indiretamente estimulando a produção de intestino fatores neuroendócrinos (Indrio 2013). Eles produzem ou estimulam a produção de aminoácidos, como GABA e triptofano (o precursor de serotonina), e monoaminas, como serotonina (5HT), histamina e dopamina, que afeta o SNE e o SNC por meio de seu transporte em por meio de seu transporte no sangue (Stilling 2014). Eles também secretam SCFAs que atuam como histonas inibidores da desacetilase (HDACs) que aumentam a transcrição do gene em neurônios (Stilling 2014). GABA, recentemente mostrou ser produzido por lactobacilos comensais e bifidobactérias em humanos e outros neuroquímicos que foram isolados de bactérias intestinais incluem noradrenalina, 5-HT, dopamina e acetilcolina (Collins 2012).

As bactérias intestinais também interagem com as células enterocromafins que são considerados transdutores de sinal bidirecionais sendo acessíveis para o microbioma entérico no lado luminal e em contato com terminais nervosos aferentes. As células enterocromafins secretam serotonina e peptídeos de sinalização, como hormônio liberador de corticotropina, colecistocinina e somatostatina (Rhee 2009).

As células imunológicas da mucosa também permanecem imunologicamente hiporresponsivas às bactérias comensais, mas também mantêm sua capacidade de resposta aos organismos patogênicos que indicam que, em condições fisiológicas, o sistema imunológico intestinal reconhece bactérias comensais e desencadeia sinais basais ou tônicos na ausência de ativação completa do inato e resposta imune adaptativa (Mayer 2011).

Portanto em condições habituais, há um equilíbrio entre o microbioma e o sistema imunológico e mudanças induzidas por antibióticos perturba este equilíbrio, resultando em perfis alterados de citocinas mediados pela ativação de receptores semelhantes a Toll (Collins 2012). Os produtos das células imunes ativadas comunicam ao cérebro para alterar a atividade neural (Maier and Watkins 1999).

#### 2.4. Uso de antibióticos, alterações no microbioma e no comportamento

A maioria das classes de antibióticos administrados por via oral para tratamento de infecções podem induzir a mudanças no comportamento. Os antibióticos mais frequentemente testados quanto aos seus efeitos de alteração no comportamento e memória são: penicilinas, quinolonas, macrolídeos e sulfonamidas (Isanaka et al. 2016, Brown et al. 2013).

Recentemente, Mohle et al. (2016) indicaram que após 2 semanas de tratamento com antibióticos mistos (vancomicina, ciprofloxacina, imipenem e metronidazol) ocorreram diminuições significativas em neurônios maduros.

Estudos mostram que a proliferação e o desenvolvimento de neurônios estão intimamente relacionados com memória e socialização. O desenvolvimento neuronal prejudicado pode causar obstáculos à constituição do centro de controle emocional, favorecendo surgimento de doenças mentais (Grenham et al. 2011, Gareau et al. 2011).

Com base em três estudos de caso-controle realizados entre 1995 e 2013, Lurie et al. (2015) descobriram que um único tratamento com antibióticos, como penicilina e quinolonas, podem causar um ligeiro aumento no risco de depressão e ansiedade. Resultados semelhantes, em estudo conduzido por Kaur et al. (2016) indicam que o uso de fluoroquinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina e moxifloxacina) para tratamento de infecções do trato urinário, sinusite bacteriana aguda ou infecções bacterianas em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica, produziram



toxicidade neuropsiquiátrica em longo prazo. Dentre os participantes, 93 de 94 entrevistados que tomaram fluoroquinolonas relataram eventos como transtorno de ansiedade (72%), depressão (62%), insônia (48%), ataques de pânico (37%) e comprometimento cognitivo (33%). Na mesma pesquisa, também foi avaliado, se o antibiótico ciprofoxacina (10 mg / kg-50 mg) administrado em camundongos C57BL causaria alterações. Foi verificado que os camundongos tratados com ciprofoxacina apresentaram menor força de preensão, equilíbrio reduzido e comportamento depressivo em comparação com os controles.

Comportamentos semelhantes à depressão foram observados em ratos recém-nascidos após intervenção com uma mistura de antibióticos (ampicilina, bacitracina, meropenem, neomicina, vancomicina), administrada por gavagem (10ml/kg) por 11 dias. Houve extensão no tempo de imobilidade em no teste de suspensão pela cauda e no teste de natação forçada (Frohlich et al. 2016).

Hoban et al. (2016) indicaram que o tratamento de ratos com uma combinação de antibióticos (ampicilina, vancomicina, ciprofloxacino e imipenem) por 6 semanas, administrados em água potável, intensificou comportamentos semelhantes aos depressivos, e deficiência cognitiva.

Jang et al. (2018) avaliaram o comportamento de camundongos tratados com ampicilina (10, 50 e 100 mg/kg/dia) por meio de gavagem, uma vez ao dia, com duração de dois dias. Os animais foram submetidos ao teste labirinto em cruz elevado. O estudo mostrou que o tempo de entrada dos camundongos nos braços abertos, foi significativamente reduzido após 2 dias de intervenção com 100 mg/kg de ampicilina, sugerindo que a intervenção com este medicamento pode induzir um comportamento semelhante à ansiedade.

Guida et al. (2018) realizaram um estudo com intervenção antibiótica combinada (ampicilina, estreptomicina e clindamicina) à água potável esterilizada (1 mg/mL) por 2 semanas, em ratos. Ocorreu uma extensão do tempo de imobilidade no local durante a natação e testes de suspensão da cauda e uma redução na exploração social.

Leclercq et al. (2017) demonstraram que a penicilina tem efeitos duradouros na microbiota intestinal. Ratas grávidas foram tratadas com penicilina V diluída em água potável, garantindo a exposição da prole ao tratamento pré-natal. Testes comportamentais foram iniciados quando a prole atingiu a idade de 6 semanas, e

animais tratados com antibióticos exibiram comportamentos sociais de ansiedade e agressividade.

Mudanças induzidas por antibióticos na microbiota intestinal também induziram mudanças na química do cérebro e comportamento. Uma associação de antimicrobianos composta por bacitracina, neomicina e pimaricina foi administrado por gavagem a camundongos durante 7 dias e o comportamento foi monitorado antes, durante e após a administração de antibióticos. Os perfis da microbiota eram monitorado usando eletroforese em gel de gradiente desnaturante. Embora nenhuma diferença nos perfis da microbiota tenha sido observada entre os grupos de teste antes dos antibióticos, o tratamento resultou em aumento da abundância relativa de *Lactobacilos* e *Actinobacteria* e uma diminuição em  $\gamma$ -proteobacteria e *Bacteroides*. As mudanças descritas induzidas por antibióticos no microbioma intestinal voltaram ao normal dentro de 2 semanas após a interrupção do tratamento e isso foi acompanhado por uma normalização do comportamento (Bercik et al. 2011).

### 3. OBJETIVOS

O objetivo geral foi avaliar o efeito do uso de agentes antimicrobianos amoxicilina e clindamicina na diversidade e na estrutura da microbiota intestinal, além das possíveis alterações de comportamento em ratos Wistar.

Os objetivos específicos foram:

- a) Determinar a composição das comunidades bacterianas imediatamente após o uso e em 7, 30, 60 e 90 dias;
- b) Comparar parâmetros de diversidade ecológica bacteriana intra- e inter-amostra (alfa-diversidade) de fezes, considerando-se o uso dos agentes antibacterianos amoxicilina e clindamicina, nos diferentes períodos de tempo;
- c) Determinar alterações comportamentais do tipo ansioso (teste de labirinto de cruz elevado), atividade locomotora (teste de campo aberto), teste de memória (reconhecimento de objetos) nos ratos antes, após o ciclo de antibioticoterapia, e em 30, 60 e 90 dias decorridos de sua interrupção.

#### **4. ARTIGO**

A seguir está apresentado o artigo referente aos resultados de culturas e sequenciamento bacterianos e comportamentais mencionados nos objetivos da tese, o qual será submetido ao periódico *International Journal of Antimicrobial Agents*. (Qualis A2, Área Ciências Biológicas II).

Effects of amoxicillin and clindamycin on animal behavior and gut microbiome in currently prescribed regimens for the treatment of infections

Effects of amoxicillin and clindamycin on behavior and gut microbiome of the wistar rats (*Rattus norvegicus*) in currently prescribed regimens for the treatment of infections

Rafaela Alves Arcanjo <sup>a</sup>

Pabulo Henrique Rampelotto <sup>b</sup>

Rodrigo Braccini Madeira Silva <sup>e</sup>

Pauline Mastella Lang <sup>c</sup>

Clarissa Cavalcanti Fatturi-Parolo <sup>c</sup>

Maria Martha Campos <sup>d,e</sup>

Francisco Montagner <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas Farmacologia e Terapêutica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>b</sup> Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS – Brazil. Alegre (HCPA), Porto Alegre/RS – Brazil.

<sup>c</sup> Programa de Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>d</sup> Escola de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre 90619-900, Brazil.

<sup>e</sup> Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Centro de Pesquisa em Toxicologia e Farmacologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga, 6681, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil.

**Running title:** Effects of amoxicillin and clindamycin on animal behavior and gut microbiome

**Keywords:** Antibiotic. Gut Microbiome. Next Generation Sequencing. Recognition memory. Anxiety.

**Corresponding Author:**

Dr Francisco Montagner  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Odontologia  
Departamento de Odontologia Conservadora  
Rua Ramiro Barcellos, 2492. – Bairro Santana.  
Porto Alegre, RS – Brazil.  
90035-003  
E-mail: francisco.montagner@ufrgs.br  
Phone: +55 51 3308 5430

## **ABSTRACT**

Antibiotics are frequently administered orally to treat bacterial infections and can have significant and long lasting effects on the gut microbiota, as well as affect psychological or behavioral conditions. Our aim was to evaluate the gut bacterial communities and behavioral parameters in rats exposed to orally administered amoxicillin and clindamycin, every 12 hours, for 3 and 7 days and over time. Male Wistar rats (N = 42, 8 weeks old) were allocated by simple randomization in four major experimental groups: two controls and two test groups. The feces pellets were collected, to evaluate the increase or decrease of colonies by using the method of bacterial culture, and sequencing used to identify and differentiate the strains were performed. Forty-two rats were assessed for behavioral changes. After the administration of either antibiotic for 3 and 7 days, there was a statistically significant change in bacterial load, with an increase in the phyla Bacteroidetes and Proteobacteria. Antibiotic-treated groups displayed reduced recognition memory changes, accompanied by an anxyogenic effect, which remained significant for 30 days in rats that had been treated with antibiotics for 7 days. Data suggested antibiotics changed the intestinal microbiome composition by antibiotics, leading to cognitive and behavioral modulation in rats.

## 1 Introduction

Bacterial infections in humans are treated with antibiotics administered orally, regardless of the actual location of the infection. In developed countries, such as the USA and Canada, it is estimated that 50% of community infections are derived from the upper respiratory tract, especially rhinosinusitis, acute suppurative, otitis media, pharyngotonsillitis, common cold cough. These infections are responsible for 41% of the prescribed antibiotics in clinical practice (Zoorob et al. 2012). In addition, it is estimated that approximately 7 to 11% of community antibacterial prescriptions are used to treat odontogenic diseases (Segura-Egea et al. 2018). Amoxicillin (AM) is the first-line antibiotics treatment in 40% of cases; however, clindamycin (CM) is an alternative drug for allergic patients to penicillins (Murphy et al. 2012).

Despite their beneficial local effects, unwanted systemic repercussions, such as interference in the microbiota of additional sites, leading to loss of species and community diversity (Tulstrup et al. 2015, Ianiro et al. 2016). Antibiotics can drastically alter the intestinal microbiota according to its class, pharmacokinetics, pharmacodynamics, spectrum, dosage, duration, and route of administration (Antonopoulos, 2009, Ianiro et al. 2016). Amoxicillin reduces microbial diversity in stool samples, especially in prolonged use (for 10 to 11 days), increasing the number of components of Proteobacteria and Bacteroidetes (Knecht et al. 2014, Yao et al. 2016). Additionally, Knecht et al. (2014) indicated an increase of Enterobacteriaceae, commonly resistant to  $\beta$ -lactam antibiotics. The excretion of clindamycin through bile promotes high concentrations in feces (Modi et al. 2014). Due to strong activity against strict anaerobes, it has been associated with *Clostridium difficile* infection (Jurburg et al. 2019). Both the short and long-term use of clindamycin have promoted changes in intestinal microbiota (Rashid et al. 2015, Jernberg et al. 2010). Disturbances due to long-term use of clindamycin relative increase in Bacteroidetes and Proteobacteria, despite an increase in the levels of specific resistance genes after a short exposure to this antimicrobial (Jurburg et al. 2019).

Recent evidence has indicated that changes in the microbiome caused by antimicrobials may promote a disorder in the brain-intestine axis by inducing behavior changes, causing depression and anxiety in humans (Huo et al. 2017, Stilling et al. 2014, Lurie et al. 2015). A study conducted by Kwon et al. (2020) affirmed that clindamycin and amoxicillin (50 mg/kg/day) added to drinking water for animals,



administered for two weeks, induced impaired object recognition memory and depression. Ceylani et al. (2018) indicated that treatment with ampicillin and cefoperazone decreased locomotor activity in the open-field test and increased anxiety levels in rodents. Therefore, antimicrobial treatment likely modulates the brain-intestine axis, potentially causing animal behavioral alterations (Leclercq et al. 2017).

Few studies have evaluated the systemic effects of antibiotics prescribed in therapeutic protocols to treat community infections (Tulstrup et al. 2015, Yao et al. 2016, Becattini et al. 2016, Burdet et al. 2019, Known et al. 2020). Therefore, this study investigated the gut bacterial communities and behavioral parameters in rats exposed to orally administered amoxicillin and clindamycin over time.

## **2 Material and Methods**

### *2.1 Ethical Statement*

The research protocol was approved by the Research Board from the Instituto de Ciências Básicas e da Saúde (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil) (Protocol number 35584) and also by the Animal Ethics Committee of the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS, Porto Alegre, Brazil) (protocol number 8961, ANEXO). The description of the data for this study is in agreement with the ARRIVE guidelines (Percie du Sert et al. 2020).

### *2.2 Experimental animals and housing*

A total number of 42 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), eight-weeks old, were obtained from the Center of Experimental Biological Models (CeMBE, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil). The animals were housed in cages (49 cm x 34 cm x 16 cm), in groups of two animals. The rats had been changed daily from each cage to allow the induction of a uniform baseline microbiome among them. They were maintained in a controlled temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and humidity (60–70%), under a 12 h light/dark cycle (lights on from 7:00 AM to 7:00 PM), with food and water *ad libitum*. The weight changes during the experiment were shown as supplementary information. For the behavioral tests, the animals were visually and acoustically isolated during the

experimental sessions. An observer, blind to the treatments, analyzed all of the experiments.

At the end of the experimental protocols (after 90 days), the animals were euthanized by deepening of isoflurane anesthesia (4-5%) vaporized in 100% O<sub>2</sub> (0.5 L/min) for up to 10 minutes after cardiorespiratory confirmation arrest.

### *2.3 Study design*

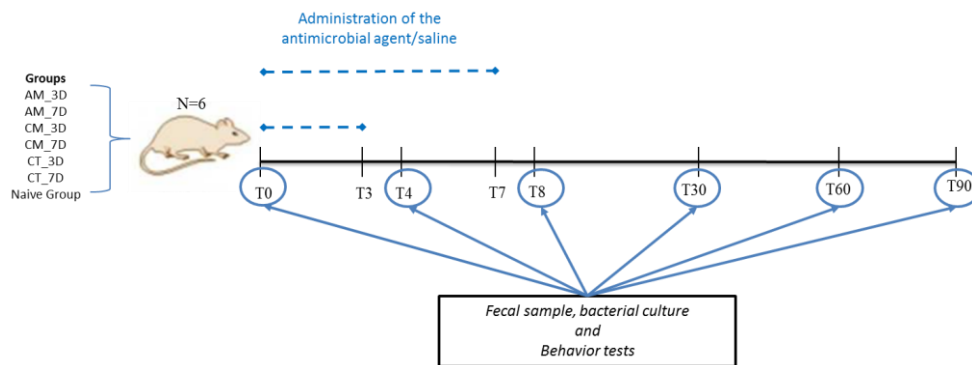
The sample size was determined according to previous reports from the literature, ranging from 4 to 10 animals per group (Tulstrup et al. 2015, Chen et al. 2018). The median number of animals was 6. The experiments were independently conducted in three different cohorts, with two animals from each group. Before treatments, the animals were distributed in the cages by simple randomization.

The animals were randomly allocated in 4 experimental, two control, and one naïve group. The experimental groups were: a) AM\_3D (n=6): amoxicillin 25 mg/kg, every 12 hours, for 3 days; b) AM\_7D (n=6): amoxicillin 25 mg/kg, every 12 hours, for 7 days; c) CM\_3D (n=6): clindamycin 25 mg/kg, every 12 hours, for 3 days; d) CM\_7D (n=6): clindamycin 25 mg/kg, every 12 hours, for 7 days. The control groups were: a) CT\_3D (n=6): group control use 0.9% saline solution, every 12 hours, for 3 days; and, CT\_7D (n=6): group control use 0.9% saline solution, every 12 hours, for 7 days. The animals from the “Naïve Group” (n=6) had not received any of the drugs or saline solution, were used only for behavior tests. The drugs and the vehicle were administered by gavage, with the aid of a curved syringe (Arkansas) (70 x15 mm). The drugs were diluted in saline in the volume of 0.5 mL for each animal. The animals from the CT (Group Control) groups had 0.5 mL of 0.9% saline solution, as described above. The treatments were performed between 07:00 AM and 07:00 PM.

### *2.4 Experimental procedures*

The protocol was designed to determine the effects of amoxicillin and clindamycin and the administration time on gut bacterial communities and the

behavioral aspects of Wistar rats. The tests/sampling were performed at T0 (before the administration of the antibiotic or saline), T3 (12 hours after the last administration of the antimicrobial agent/saline in the 3 day-regimen), T7 (12 hours after the last administration of the antimicrobial agent/saline in the 7 day-regimen), T30 (30 days after T3 or T7), T60 (60 days after T3 or T7), and T90 (90 days after T3 or T7). For the Naive Group, weekly weight and behavior tests (T0, T3, T7, T30, T60 and T90) were performed on the animals. The body weight was determined before starting the treatment with antibiotics, and weekly, up to 90 days. **Figure 1** shows the time-line diagram to illustrate the study design.



**Fig. 1.** Study workflow. The feces pellets were collected, and bacterial culture was performed in 36 rats. The pellets were collected, tests/sampling and behavior tests were performed at T0 (all groups, before the administration of the drug or saline), T3 (AM\_3D, CM\_3D and CT\_3D, animals received 3 day-regimen of antibiotics or saline), T4 (AM\_3D, CM\_3D and CT\_3, 12 hours after the last administration of the antimicrobial agent/saline in the 3 day-regimen), T7 (AM\_7D, CM\_7D and CT\_7D, animals received 3 day-regimen of antibiotics or saline), T8 (AM\_7D, CM\_7D and CT\_7D, 12 hours after the last administration of the antimicrobial agent/saline in the 7 day-regimen), T30 (30 days after T3 or T7), T60 (60 days after T3 or T7), and T90 (90 days after T3 or T7). The behavior tests were performed in 42 rats (including naive group) in all groups (T0, T4, T8, T30, T60, T90).

## *2.5 Microbiological analyses*

### *2.5.1 Fecal sampling, initial processing and Bacterial culture*

A detailed description of the methods used for fecal sampling, initial processing and bacterial culture is provided in Supplementary Material. Briefly, the feces pellets collected were individually placed into sterilized, DNase free, and pre-weighed plastic tubes with glass beads. Serial 10-fold dilutions were made up to 1:10<sup>8</sup> in tubes containing PBS. The plates were incubated at 37°C in anaerobic jars with anaerobic generators (Anaerobac, PROBAC do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda, São Paulo, Brazil) for up to 7 days.

### *2.5.2 DNA Extraction, 16S rRNA Sequencing*

A detailed description of the methods used for 16S ribosomal RNA gene sequencing and analyses is provided in Supplementary Material. Briefly, after DNA extraction, the V4 hyper-variable region from the 16S rRNA gene was amplified using the 515F–806R primer pair and sequencing was performed with Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, USA). A custom pipeline in Mothur was used for 16S rRNA reads processing.

## *2.6 Behavioral tests*

A detailed description of the methods used for behavior tests is provided in Supplementary Material. Briefly, the animals were evaluated in the Open Field Test with locomotor activity as a measure of anxiety, Elevated plus-maze were evaluated the movement of the animals on a cross-shaped apparatus with two arms with open sides and two arms with sidewalls with anxiety was measured. For evaluate the memory were Object Recognition Test, the animals were exposed to two identical objects A1 and A2, and the exploration time of each object was evaluated, twenty-four hours after training (long-term memory), object A2 was replaced by another object.

## *2.7 Data Analyses*

A detailed description of the data analyses used for bacterial culture, behavioral tests, microbial communities and 16s rRNA sequencing is provided in Supplementary Material.

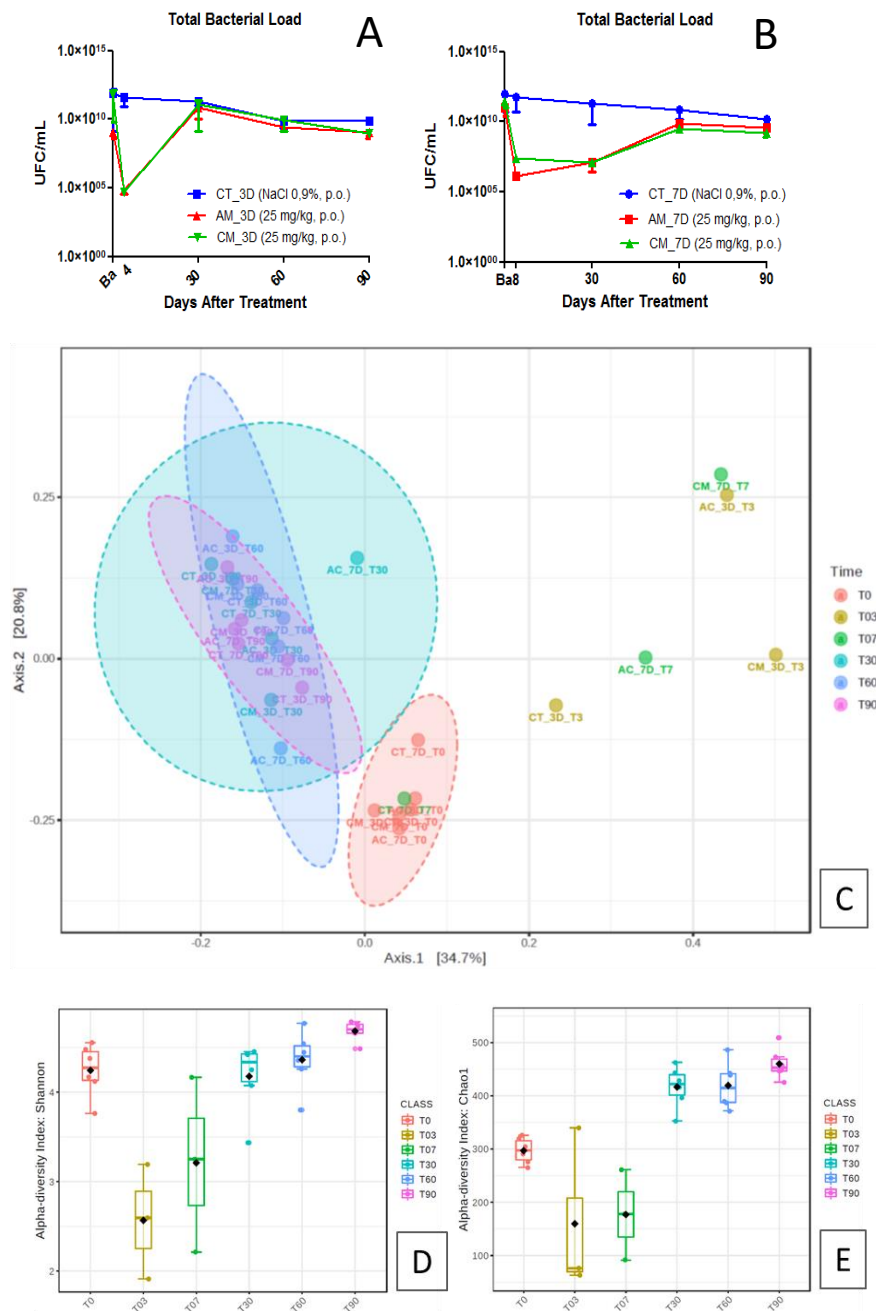
### 3 Results

The animal body weight gain did not differ among groups at any experimental time-point (Supplementary Fig. 1).

#### *3.1 Changes in bacterial load after antibiotic treatment*

After the administration of antimicrobials for 3 days, there was a statistically significant change in bacterial load in the AM and CM groups ( $P = 0.0022$ ), in comparison with the Control group. However, there was no difference between the AC and CM groups. For animals that received antimicrobials for 7 days, a significant decrease in the number of bacterial colonies was observed shortly after the administration of AM or CM (Fig.2A,  $P = 0.0022$ ), remaining altered even after 30 days of administration (Fig.2B, AM7  $P = 0.0043$ ; CM7  $P = 0.0247$ ).

Principal coordinates analysis (PCoA) using Bray–Curtis metric showed that antibiotics exposure changed the faecal microbiome in for both antibiotics (T03 and T07) (**Fig. 2C**;  $P < 0.05$ , ANOSIM). After 30-90 days (T30, T60, T90), the microbiome is restored, but with a baseline composition different from control (T0) (**Fig. 3C**;  $P < 0.05$ , ANOSIM). Alpha diversity indices indicated that samples had different degrees of richness and diversity related to the time of treatment for both antibiotics. Similar values to baseline (T0) were observed for Shannon index in 30/60/90 days after exposure to the treatment (**Fig.2D**). Considering the baseline values (T0), Chao-I index decreased after 3/7 days exposure to antibiotics, and increased after 30/60/90 days after exposure to the treatment (**Fig.2E**).

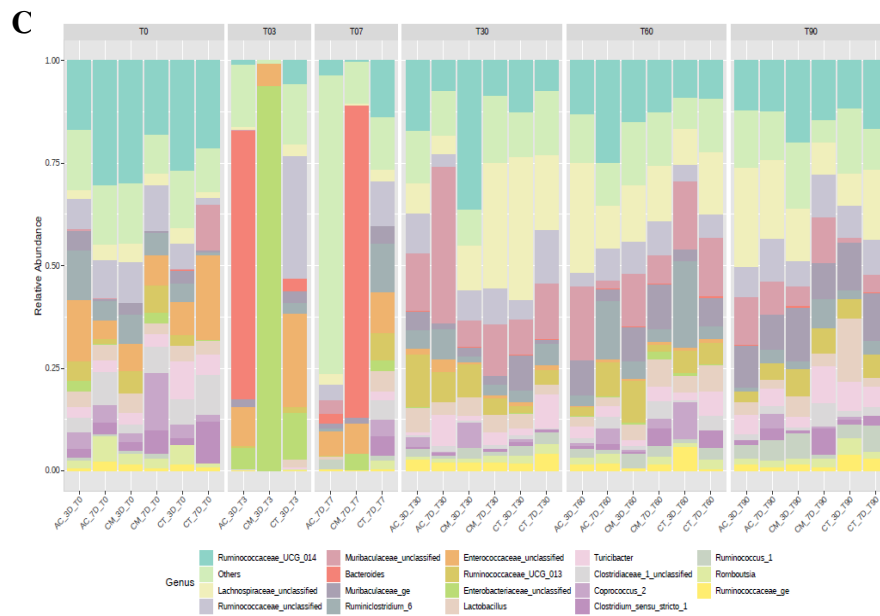
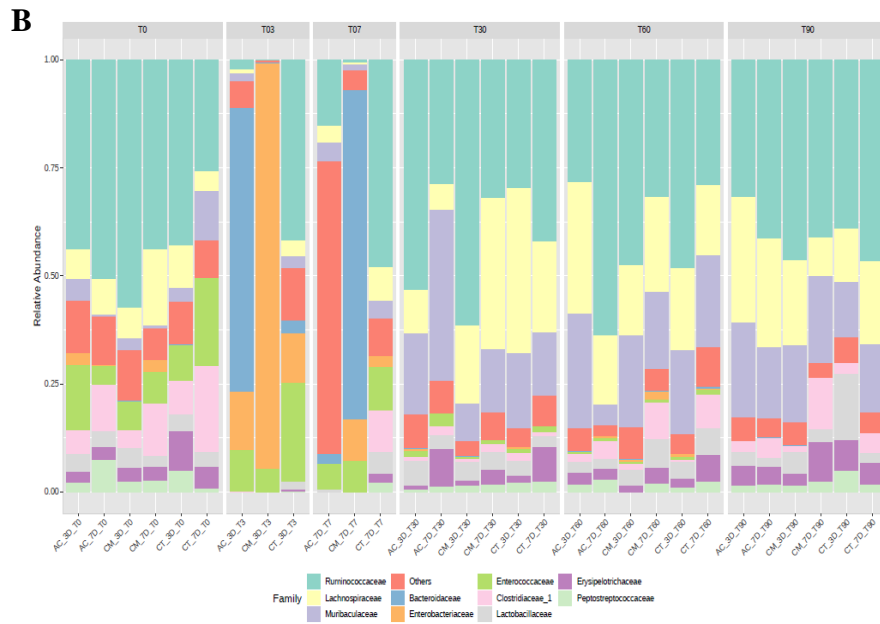
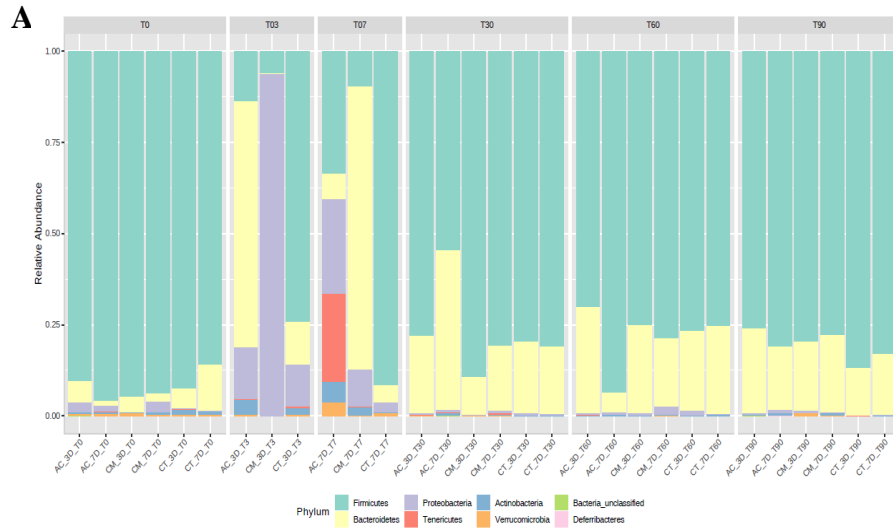


**Fig. 2** Bacterial communities in stool samples: A) Number of CFU/mL after administration of antibacterial agents for 3 days, in the initial periods, 4, 30, 60 and 90 days; B) Number of CFU/mL after administration of antibacterial agents for 7 days, in the initial periods, 8, 30, 60 and 90 days; C) Principal coordinates analysis (PCoA) of the bacterial community structures, based on Bray-Curtis distance; D) Shannon Index; E) Chao-I diversity index.

A total 72 bacterial taxa (OTUs) were identified in all samples, belonging to 70 genera, 32 families and 8 phyla. Their relative abundances are presented in Fig. 4. Differential abundance analysis identified 21 genera associated with the time after exposure to the antibiotics (Table 1).

In table 1 shows a significant increase and decrease in bacterial genera immediately after the administration of the drugs (T3 / T7) and after 30, 60 and 90 days of using them.





**Fig 3.** Relative abundance of the phyla (2A), families (2B) and genus (2C) detected in the feces: before administration of antimicrobials (T0), after administration of antibacterial agents for 3 (T03), 7 (T07), 30 (T30), 60 (T60), and 90 days (T90) after administration of antibacterial agents.

**Table 1.** Differential abundance analysis at the genus level.

Time	Up	Down
T3	Enterobacteriaceae_unclassified	Clostridiaceae_1_unclassified
T7	<i>Morganella</i> <i>Parabacteroides</i>	Clostridium_sensu_stricto_1 <i>Romboutsia</i> <i>Rothia</i> Ruminiclostridium_5 <i>Turicibacter</i> Ruminococcaceae_ge Ruminococcaceae_NK4A214_group Ruminococcaceae_UCG_014
T30	Bacteroidales_unclassified	<i>Akkermansia</i>
T60	GCA_900066575	
T90	Lachnospiraceae_NC2004_group Lachnospiraceae_unclassified Muribaculaceae_ge Muribaculaceae_unclassified <i>Ruminiclostridium</i> <i>Ruminiclostridium_9</i>	

### *3.2 Effects of antibiotics on animal behavior*

#### *3.2.1 Plus maze test*

The analysis of the animal behavior in the elevated plus-maze test demonstrated a significant increase in the time spent in closed arms, right after the use of antimicrobials for 3 (Fig.4A,  $P = 0.0340$ ) and 7 days (Fig. 4A,  $P < 0.0001$ ). For animals that were treated with the drugs for seven days, it was observed that the time spent in the closed arms remained significantly longer after the 30 days of drug administration (Fig. 4B,  $P = 0.0006$ ).

#### *3.2.2 Open field test*

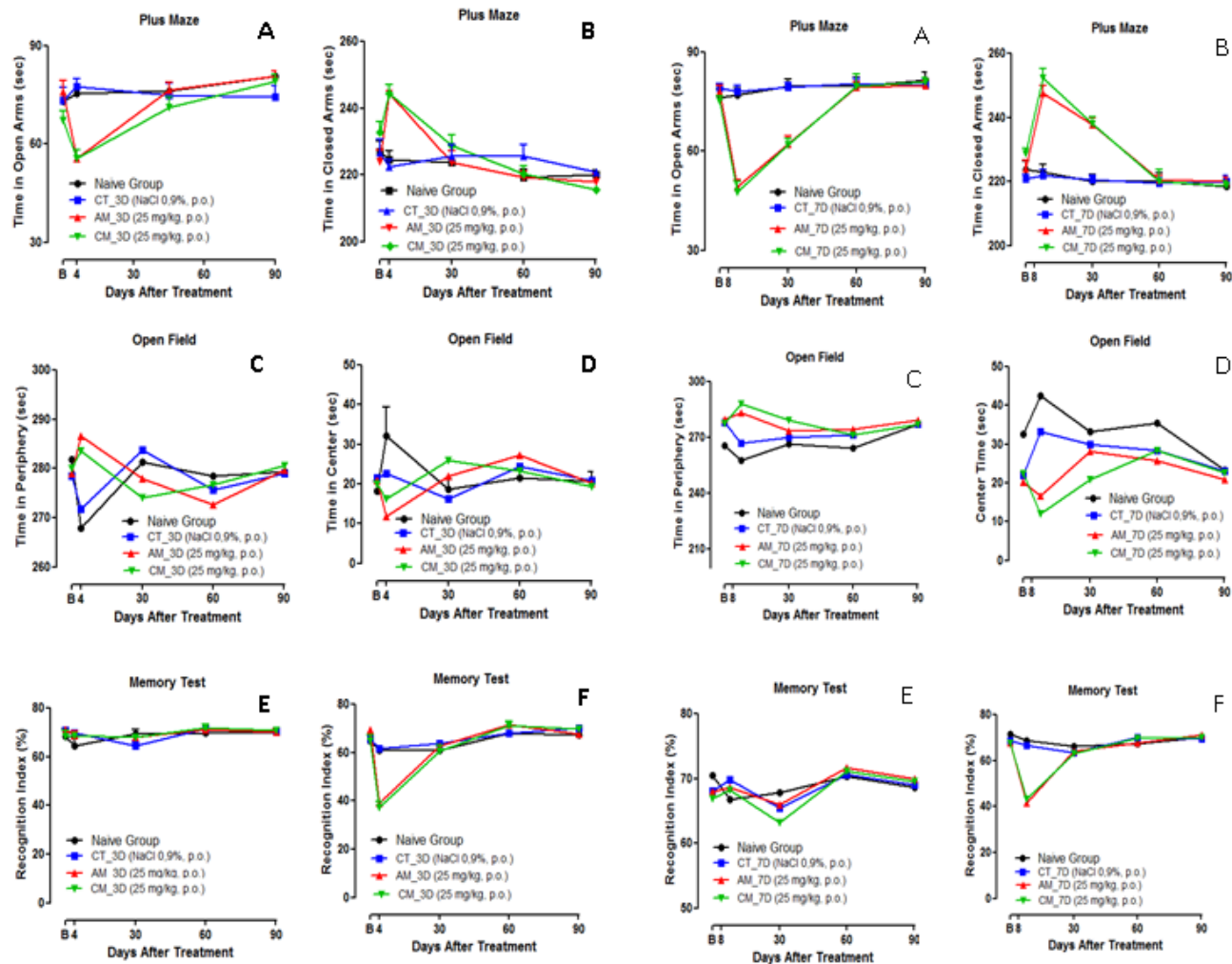
The locomotor activity on the periphery and in the center of the apparatus did not show statistically significant differences for the animals that used antibiotics for 3 days (Fig. 4C, 4D,  $P > 0.005$ ). For groups of animals that used antibiotics for 7 days, the time in the center of the apparatus proved to be significantly less than the time on the periphery of the apparatus (Fig. 4C, 4D,  $P < 0.005$ ), with this difference not remaining among groups after 30 days (Fig.4C, 4D).

#### *3.2.3 Object recognition test*

The task was performed in the sessions before, after 3, 7, 30, 60, and 90 days after using antimicrobials. Antibiotic treatment decreased the rats' ability to explore a new object. The total exploration of the objects differed in the tests performed immediately after the use of antimicrobials in the groups of 3 (Fig 4F,  $P = 0.0009$ ) and 7 days (Fig.4F,  $P < 0.0001$ ).

3 Days

7 Days



**Fig. 4.** Behavioral parameters in rats that used antibacterial agents for 3 or 7 days: (A) Plus maze test, length of stay in the open arms; (B) Plus maze test, time spent in a closed arms; (C) Open field test, time spent on the periphery; (D) Open field test, length of stay in the center; (E) Object recognition test, previously known objects; (F) Object recognition test, new objects.

#### 4. Discussion

The administration of amoxicillin and clindamycin for 3 and 7 days resulted in significant changes in bacterial composition and diversity in stool samples. Immediately after exposure to antimicrobials, the Chao-I index was lower, indicating that the species richness decreased; however, the samples evaluated 30/60 and 90 days after exposure increased over time. Alpha diversity indices indicated that the samples showed different degrees of richness and diversity with antibiotics treatment times. Differences in alpha diversity in intestinal microbiomes have been associated with depressive symptoms and major depressive disorder. According to Jiang et al. (2015), Shannon's diversity also differed between patients who met major depressive disorder criteria and healthy controls.

It is well documented that antibiotics can modify the diversity of bacteria present in the intestine and cause losses in functional diversity and resistance to colonization against invading pathogens (Ianiro et al. 2016, Yao et al. 2016, Burdet et al. 2019). However, few studies evaluated the effects of amoxicillin and clindamycin on the intestinal microbiome, using the combination of doses calculated based on human doses (in mg per kg of body weight). For scaling dose of antibiotics for rat models, it was necessary to consider the differences of species in weight and body surface area (Bachmann et al. 1996). The doses were calculated comprising protocols from 3 and 7 days (Know et al. 2020, Tulstrup et al. 2015, Rashid et al. 2015). Tulstrup et al. (2015) and Know et al. (2020) have evaluated changes in the microbiome after using these antimicrobials for longer than 7 days and usually considered samples collected after 10 to 14 days of treatment. Short-term treatment with low-dose antibiotics administered by gavage has been demonstrated by Fröhlich et al. 2016 as a valid model for probing causality in microbiota-dependent changes in brain function and behavior, with approaches to the multiple actions of antibiotic treatment along the gut-brain microbiota axis and their comparisons with the relevant Germ Free mouse phenotype.

The culture-based method revealed decreased bacterial load immediately after antibiotics treatment (for both 3 and 7 days). At T30-T90, there was an increase in total bacterial load, suggesting stability of the viable microbial population. However, the sequencing method demonstrated significant qualitative changes, allowing for the detection of new microbial community members. It can be justified due to the proliferation of commensal bacteria that found new niches within the intestine, as observed in previous studies (Tulstrup

et al. 2015, Guida et al. 2018).

Firmicutes were the most abundant phyla found in the gut microbiome, as reported by Khan et al. (2014). In T3 and T7, there was an increase in phyla of Bacteroidetes and Proteobacteria. In a study conducted by Antonopoulos et al. (2009), the combined intake of amoxicillin, metronidazole, and bismuth reduced the presence of Firmicutes and increased the populations of Bacteroidetes and Proteobacteria. Mice treated with different combinations of antibiotics (vancomycin + imipenem, cephalothin + neomycin and amoxicillin + metronidazole + bismuth) responded with a dramatic reduction of more than 50% of the Firmicutes species and increased Proteobacteria (Enterobacteriaceae) (Kuribayashi et al. 2012, Dethlefsen et al., 2008). Amoxicillin markedly altered the composition of the intestinal microbiota microbiome and increased the abundance of ampicillin-resistant *Enterococcus* spp. (Zimmermann et al. 2019). Microbial diversity reduction in fecal microbiomes was observed 5 days after administering clindamycin (50mg/kg) to pigs. However, the relative abundance of Proteobacteria increased 1 day after the use of the antibiotic, particularly for genera *Escherichia*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Prevotella* and *Succinivibrio* (Jurburg et al. 2019). In addition, male mice aged 6 to 8 weeks and treated with clindamycin by gavage increased the load of enterobacteria, including drug-resistant strains in the gut microbiome, persisting after treatment (Jenior et al. 2018). Ampicillin, Streptomycin and Clindamycin (ASC) diluted into sterile drinking water and administered for 14 days to animal drastically changed the intestinal microbiota's overall composition, decreasing the bacterial diversity when compared to controls (Guida et al. 2018). Perturbation of microbiota was accompanied by a general inflammatory state and alteration of some endocannabinoidome members in the gut. There was also a persistent increase in alpha diversity parameters 15 days after antibiotic ceasing administration.

Changes in the number and diversity of bacteria in the intestine might lead to various diseases and behavior changes (Fröhlich et al. 2016, Becattini et al. 2016). Conceptually, the gut microbiota's effects on the brain may involve metabolic, immune, endocrine, and neuronal pathways (Jiang et al. 2015, Noble et al. 2017, Huo et al. 2017, Jenior et al. 2018). However, gut microbiota-brain communication is still insufficiently understood.

The open field and plus-maze tests were conducted on animals treated with antibiotics for 3 and 7 days to investigate whether antibiotic treatment affects locomotor activity and anxiety behavior. In the plus-maze test, animals remained more extended periods

in the closed arms of the apparatus. In addition, for those treated with antibiotics for 7 days, this behavior extended up to 30 days after treatment. In the open field test, the animals belonging to groups treated with antibiotics for 7 days stayed more extended periods on the arena's periphery than the others. This behavior also persisted for 30 days after treatment. Locomotor activity and anxiety were significantly altered by treatment with clindamycin and amoxicillin. The object recognition test was employed to determine the effect of antibiotic treatment on the recognition memory. The results suggested a decrease in the animals' ability to explore a new object immediately after the treatment, despite the period of antimicrobial agent. Ceylani et al. (2018) showed that mice treated with ampicillin had decreased locomotor activity in the open field and increased anxiety levels. Additionally, an increase in immobility that may suggest depression behavior was demonstrated in the forced swimming test. On the other hand, a recent study showed that treatment with amoxicillin and clindamycin had no significant locomotor activity changes and similar to anxiety behavior. However, treatment with clindamycin or amoxicillin induced impairment in recognizing new objects and increased response similar to depression (Kwon et al. 2020).

Kwon et al. (2020) performed the object recognition test in mice treated with amoxicillin and clindamycin for two weeks and observed that animals in the control group preferred exploring the new object compared to animals treated with antibiotics had a shorter exploration time for the new object. Fröhlich et al. (2016) identified that the intragastric administration of a mixture for 11 days ampicillin, bacitracin, meropenem, neomycin, and vancomycin hindered the recognition of new objects. Animals belonging to the test group had a lower memory index than animals treated with vehicles, which indicated that mice spent less time exploring the new object than the known object.

In the present study, at T3 and T7, there was a significant increase in three bacterial taxa Enterobacteriaceae\_unclassified, *Morganella*, and Parabacteroides. Jiang et al. (2015) detected higher levels of Enterobacteriaceae and Alistipes in adult patients with depression, differences in alpha diversity, and specific bacterial rate levels in intestinal microbiomes. Increased permeability of the gut wall in depressed patients may allow invasive Gram-negative bacteria to translocate into mesenteric lymph nodes or the systemic circulation (O'Malley et al. 2010). Therefore, Enterobacteriaceae and *Morganella morganii* may be related to increased depression since this is accompanied by increased plasma immunoglobulin IgA and/or IgM, which were directed against them (Maes et al. 2012). The



genus *Parabacteroides* showed different abundance in mice exposed to social stressors (Bailey et al. 2011). A study by Noble et al. (2020) indicated that the consumption of sugar in animals in early life modified the microbial composition. An increase in *Parabacteroides* caused a loss in the performance of the recognition test of new objects, negatively affecting learning.

Despite the antimicrobial agent at T3 and T7, there was a decrease in the differential abundance for the genera *Clostridium\_sensu\_stricto\_1*, *Romboutsia*, *Rothia*, *Ruminoclostridium\_5*, *Turicibacter*, and for *Ruminococcaceae*.

The increase in *Rothia* spp. in samples of feces from pregnant women indicated intense anxiety during prenatal care (Hechler et al. 2019). The increase in this bacterial genus is associated with decreased fermentation of complex carbohydrates and peptides/proteins in primary metabolites (free amino acids, short-chain fatty acids). Its decrease has been associated with irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease (Gao et al. 2018).

Changes in intestinal microbiota in male C57/6 adult mice (8 weeks old) with a chronic stress-induced depression model, followed by treatment with fluoxetine, led to dysbiosis. Fluoxetine promoted a significant increase in different bacterial genera, including *Romboutsia* (Sun et al. 2019). This bacterial genus has been commonly identified in the human gut and is often associated with patients' healthy states. The drastic reduction in the genus *Romboutsia* can represent a potential microbial indicator of a disease condition (Naumova et al. 2020). After stress induction, the depression caused in rats contributed to an increase in the prevalence of Clostridiaceae in the cecum (Bailey et al. 2011). However, Jiang et al. (2015) reported that *Clostridium*, *Ruminococcus* and *Haemophilus* were abundant in healthy patients compared to patients with major depressive disorder. Further studies are warranted to determine specific fluctuations in family/genus members and their metabolic profiles in the gut microbial communities, which may modulate behavioral diseases' sign/symptoms.

In murine models, intense exercise-induced stress exacerbated intestinal inflammation and clinical outcomes, decreasing the presence/abundance of *Turicibacter* (Firmicutes) (Allen et al. 2015). The increase in the intestinal content of *Turicibacter* was correlated with the increase in butyric acid, a short-chain fatty acid with immunomodulatory potential, which stimulates the ruminal papillae and microvilli of the enterocytes, as well as the digestion and absorption of specific nutrients. Suchodolski et al. (2012) also indicated possible anti-inflammatory effects of *Turicibacter* metabolites.

There was a significant decrease in Ruminococcaceae immediately after the administration of antimicrobials (T3/T7), which may be associated with gut-barrier alterations. Anxiety and depression in humans had been associated with fluctuation in OTUs belonging to the family Ruminococcaceae (Humbel et al. 2019, Chen et al. 2019). Leclercq et al (2014) indicated alcohol dependent subjects with high intestinal permeability had a drastic decrease in the abundance of *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, *Subdoligranulum*, *Oscillibacter*, and *Anaerofilum*. All of these genera belong to the Ruminococcaceae family. Therefore, alcohol-dependent subjects developed gut leakiness, which was associated with higher scores of depression and anxiety. In the present study, rats also had behavioral alterations in those periods.

In the present study, no behavioral alteration was observed for T30-T90, as compared to control groups. The differential abundance analysis indicated an increase from members of Bacteroidales, Lachnospiraceae, Muribaculaceae, and Ruminiclostridium. The results are controversial in the literature. Patients with excessive anxiety, depression and perceived stress were found to have high abundance of Bacteroidaceae, a member of the Bacteroidales order (Peter et al. 2018). The family Lachnospiraceae is an important component for maintaining the intestinal barrier, as a family known for its butyrate production (Naseribafrouei et al. 2014). Zhou et al. (2020) indicated an association between depression and a decrease in the abundance of this family in human feces (Zhou et al. 2020). Schmidtner et al. (2019) reported that a positive correlation was found between the abundance of Lachnospiraceae and 3-OH-butyrate in high anxiety-like behavior male rats. Those animals had decreased relative abundance of the Lachnospiraceae when compared to rats non-selected for anxiety. Muribaculaceae are the main monosaccharide degraders derived from intestinal mucus in mice (Williams et al. 2011), and are abundantly found in animals with cognitive disorders (Zhou 2020). The decrease of the Muribaculaceae may be associated with no behavioral alteration in T30-T90.

There was a significant decrease in components of the genus *Akkermansia* in the fecal samples, at 30 to 90 days after the use of antimicrobials. The use of second and fourth generation quinolones inhibited *in vitro* several species, except *Akkermansia muciniphila* (Maier et al. 2020). It is associated as a protective bacterial several diseases and dysbiotic states such as obesity, type 2 diabetes, inflammatory bowel diseases, hypertension and liver diseases (Cani and de Vos 2017, Zhou et al. 2020). Significant reductions in *Akkermansia*

*spp.* in feces of socially stressed animals that exhibited decreased central time during the open field test can indicate increased anxiety-like behavior (McGaughey et al. 2019). Member of the genus *Akkermansia* have demonstrated the ability to produce acetate and propionate as products of mucus degradation (Zhou 2020). It is important to note that the production of these short-chain fatty acids appears located within the mucus layer, close to the epithelial cells, which serve as an interface for the interaction between the intestinal microbiota and the host tissues (McGaughey et al. 2019).

## **5. Conclusion**

The host-microbial interactions from the gut microbiome perspective are complex and seemed to be strongly modulated by antibacterial agents. This study showed that the treatment of rats with amoxicillin and clindamycin for 3 and 7 days, according to the dosage used in clinical practice, can produce changes in the intestinal microbiome, significant changes in viable bacterial load. Microbial communities were modulated by the antimicrobial use over time, contributing to low performance in cognitive tests with difficulty in recognizing new objects and anxious behavior.

## Supplementary Material

### Material and Methods

#### *Fecal sampling and initial processing*

The feces pellets were collected after an abdominal massage. The pellets that layered over sterilized material were retrieved with sterilized metallic pliers. Two pellets were collected from each animal in each period. They were individually placed into sterilized, DNase free, and pre-weighed plastic tubes with glass beads. The pellet weigh was determined subtracting the initial from the final weight of the tube. All samples were assigned codes.

#### *Bacterial culture*

After sampling, sterilized saline was immediately added to reach the proportion of 1 mg of feces to 1  $\mu$ L of phosphate-buffered saline (PBS). Inside the laminar flow chamber, the sample with the saline was shaken thoroughly in a mixer for 60 s (Vortex, Marconi, São Paulo, SP, Brazil). Serial 10-fold dilutions were made up to  $1:10^{-8}$  in tubes containing PBS. The spotting technique was employed to determine the number of colony-forming units (CFUs) per mL. Three drops (25  $\mu$ L) of each serial dilution  $1:10^{-3}$ ,  $1:10^{-4}$ ,  $1:10^{-5}$ , and  $1:10^{-6}$  were plated into Brain Heart Infusion to culture non-selectively obligate anaerobes and facultative anaerobes. The plates were incubated at 37°C in anaerobic jars with anaerobic generators (Anaerobac, PROBAC do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda, São Paulo, Brazil) for up to 7 days. The number of CFUs in each spot was determined through visualization. The dilution allowed for counting separate bacterial colonies was chosen to calculate the number of CFUs for a sample. Then, the median value of CFUs determined from the three drops was considered to reach the number of CFU/mL in the initial sample.

#### *DNA Extraction, 16S rRNA Sequencing*

Bacterial DNA was isolated from fecal samples using the QIAamp PowerFecal DNA Kit (QIAGEN, Valencia, CA), following the manufacturer's instructions. Pooled

samples were assembled for each test group, in the different periods of sampling. Pooled samples were created by mixing an aliquot of 100  $\mu$ L of each individual sample. Samples were standardized to a concentration of 20 ng/ $\mu$ L. Pools were then labeled as described in the Figure 1.

The hypervariable V4 region from the rRNA gene was amplified by PCR using the following primer pair: 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') and 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'). To pool different samples in the same reaction, we used the primer-fusion method and each sample had a distinct barcode attached on the corresponding PCR product. The purified products were subjected to emulsion PCR using Ion PGM™ Hi-Q™ view OT2 kit (Thermo Fisher Scientific, USA). After, the resulting enriched beads were sequenced in an NGS machine (Ion Torrent PGM, Life Technologies) using Ion PGM™ Hi-Q™ view sequencing kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

### *Behavior Tests*

#### *Open field test*

The animals were evaluated in the open-field test, according to the methodology described by Ploeger and Spruijt (1992), before treatment/control exposure and in different experimental periods (T0, T4, T8, T30, T60, T90). They were placed in the left rear corner of the apparatus and were monitored to observe the exploratory profile for 5 minutes. The number of displacements (when the animal places all four legs in any of the squares) is associated with the locomotor activity; and the time that the animal remained on the sides and center of the apparatus is a measure of anxiety. The number of fecal pellets at the end of the period were registered. The apparatus was cleaned between each animal change with 30o ethanol.

#### *Elevated plus-maze*

Anxiety was also measured in the elevated plus-maze, according to the methodology as described previously by Lister (1987). It consists of evaluating the movement of the animals for five minutes on a cross-shaped apparatus with two arms with open sides and two arms with sidewalls that provide apparent protection for the animal. The apparatus

consists of a black wood cross maze, raised to a height of 50 cm above ground level. It has two open arms and two closed arms (50 cm x 40 cm x 10 cm), which extend from a common central platform (10 cm x 10 cm). The time spent in open-arms, closed-arms and the center platform was recorded as a measure of an anxiety state.

#### *Object recognition test*

The animals were exposed to an object recognition task in the open field arena. In the training session, the animals were exposed to two identical objects A1 and A2, and the exploration time of each object was evaluated. After 30 seconds (on both objects), the animal was removed from the arena. Twenty-four hours after training (long-term memory), object A2 was replaced by another object. The exploration time of the objects was evaluated for 5 minutes. Exploration represented the act of smelling and touching the object. The recognition index was calculated for each animal, as described by Pietá-Dias and collaborators (2007).

#### *Data Analyses*

##### *Bacterial culture analyses*

Data analysis was conducted through the statistical package GraphPad PRISM (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, version 8.4.3). The statistical significance level was set at 5%. The normality of the data was determined through the Shapiro-Wilk test. The changes in microbial counts over time in the same experimental group, were determined using the Friedmann test. The Kruskal-Wallis test was employed to determine the difference in the bacterial counts between groups in the same period of time.

##### *Behavioral tests analyses*

Data analysis was conducted through the statistical package GraphPad PRISM (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, version 8.4.3). The statistical significance level was set at 5%. The normality of the data was determined through the Shapiro-Wilk test. The analysis of changes in the animals' behavior over time, in the same experimental group, was determined using Friedmann's test.

## *Bioinformatic analyses*

### *16S rRNA reads processing for downstream analyses*

The sequence data exported from the Miseq System was processed using a custom pipeline in Mothur v.1.44.3 (Schloss *et al.* 2009). Initially, sequences were depleted of barcodes and primers (where no mismatch was allowed) and then a quality filter was applied to eliminate low-quality reads. Quality control was conducted by trimming low-quality reads, those with incorrect length, those containing an ambiguous base, or those containing homopolymers longer than 8 bp. All potentially chimeric sequences were identified and removed using VSEARCH (Rognes *et al.* 2016).

After these initial quality filtering and trimming steps, the remaining sequences were clustered into Operational Taxonomic Units (OTUs) based on a 99% identity level and were classified against the SILVA v132 reference database at 97% similarity (Quast *et al.* 2013). Sequences that could not be classified (i.e., “unknown” sequences), as well as sequences identified as eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts, were removed before further analysis.

An additional filtering step was performed by removing OTUs with less than 10 reads to reduce spurious OTUs caused by PCR or sequencing errors. The resulting OTU table was normalized using the cumulative sum scaling (CSS) method. For alpha diversity analysis, the OTU table was rarefied to the smallest library size. Subsequent analyses of the sequence dataset were performed in R v. 3.6.1 (using *vegan*, *phyloseq*, *ggplot2*, and *MicrobiomeAnalystR* packages).

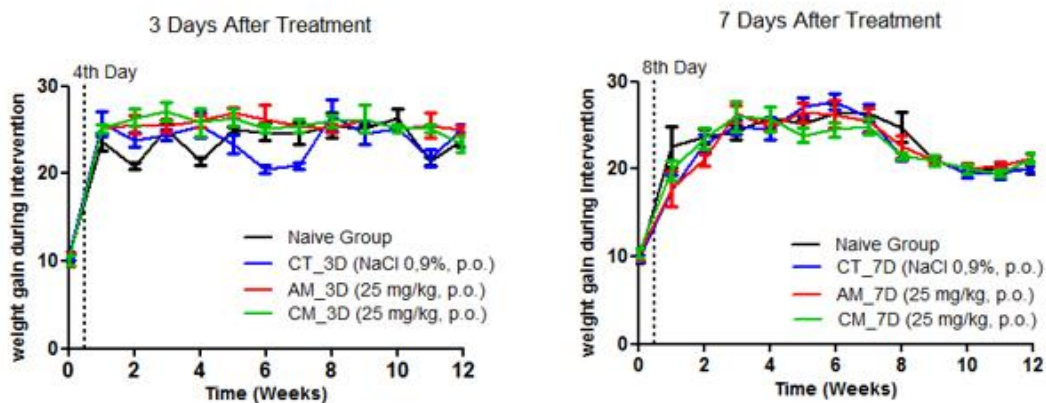
### *Microbial communities and statistical analysis*

Alpha-diversity was assessed using species richness indices (Chao1) and species diversity indices (Shannon). Principal coordinates analysis (PCoA) was conducted to compare significant differences between bacterial communities (i.e., to estimate beta diversity). A matrix using phylogenetic and non-phylogenetic metrics (weighted Unifrac and Bray-Curtis dissimilarity, respectively) was calculated for each pair of samples. Distances were translated into points in space with one fewer dimension than the number of samples. The ANOSIM

multivariate test was run on the distance matrix to obtain statistical confidence for the sample grouping observed by PCoA.

The linear discriminant effect size (LEfSe) method was employed to analyze differentially abundant taxa (Segata et al. 2011). This algorithm performs a nonparametric factorial Kruskal-Wallis sum rank test and linear discriminant analysis (LDA) to determine statistically significant different features between taxa and estimates the effect size of the difference. Differences were considered significant beyond a logarithmic LDA score threshold of  $\pm 1.0$  and a P-value  $< 0.05$ .

### Supplementary Figures



**Supplementary Figure 1.** Effects of antibiotics on weight gain during the intervention (week 0 to 12). Significant differences between the treatment groups and the control group were determined by the Mann Whitney test (# P  $< 0.05$ , ## P  $< 0.01$ , ### P  $< 0.001$ ). CT\_3D, use 0.9% saline solution; AM\_3D, use of amoxicillin for 3 days; CM\_3D, use of clindamycin for 3 days; CT\_7D, use 0.9% saline solution; AM\_7D, use of amoxicillin for 7 days; CM\_7D, use of clindamycin for 7 days.



## References

- Allen JM, Berg Miller ME, Pence BD, Whitlock K, Nehra V, Gaskins HR, White BA, Fryer JD, Woods JA. Voluntary and forced exercise differentially alters the gut microbiome in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol* 2015; 118:1059-66.
- Antonopoulos DA, Huse SM, Morrison HG, Schmidt TM, Sogin ML, Young VB. Reproducible Community Dynamics of the Gastrointestinal Microbiota following Antibiotic Perturbation. *Infection and Immunity* 2009; 77:2367–2375.
- Bachmann K, Pardoe D, White D. Scaling basic toxicokinetic parameters from rat to man. *Environ Health Perspect* 1996; 104:400-407.
- Bailey MT, Dowd SE, Galley JD, Hufnagle AR, Allen RG, Lyte M. 553 Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: 554 implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain Behav Immun* 2011; 25:397-407.
- Becattini S, Taur Y, Pamer EG. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. *Trends in Molecular Medicine* 2016; 22:458-478.
- Burdet C, Nguyen TT, Duval X, Ferreira S, Andremont A, Guedj J, Mentré F. Impact of Antibiotic Gut Exposure on the Temporal Changes in Microbiome Diversity. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; 63: e00820-19.
- Cani PD, de Vos WM. Next-Generation Beneficial Microbes: The Case of *Akkermansia muciniphila*. *Front Microbiol* 2017; 8:1765.
- Ceylani T, Jakubowska-Doğru E, Gurbanov R, Teker HT, Gozen AG. The effects of repeated antibiotic administration to juvenile BALB/c mice on the microbiota status and animal behavior at the adult age. *Heliyon* 2018;4: e00644.
- Chen T, You Y, Xie G, Zheng X, Zhao A, Liu J, et al. A strategy for association study on intestinal microbiome and brain metabolome across lifespan of rats. *Anal Chem* 2018; 90:2475-83.
- Chen YY, Chen DQ, Chen L, Liu JR, Vaziri ND, Guo Y, Zhao YY. Microbiome-metabolome reveals the contribution of gut-kidney axis on kidney disease. *J Transl Med* 2019; 17:5.
- Dethlefsen Huse S, Sogin ML, Relman DA. The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. *PLoS Biology* 2008; 6: e280.
- Fröhlich EE, Farzi A, Mayerhofer R, et al. Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota-brain communication. *Brain Behav Immun* 2016; 56:140-155.
- Gao R, Zhu C, Li H, Yin M, Pan C, Huang L, et al. Dysbiosis Signatures of Gut Microbiota Along the Sequence from Healthy, Young Patients to Those with Overweight and Obesity. *Obesity* 2018; 26:351-361.
- Guida F, Turco F, Iannotta M, De Gregorio D, Palumbo I, Sarnelli G, et al. Antibiotic-induced microbiota perturbation causes gut endocannabinoidome changes, hippocampal neuroglial reorganization and depression in mice. *Brain Behav Immun* 2018; 67:230-245.

- Hechler C, Borewicz K, Beijers R, et al. Association between Psychosocial Stress and Fecal Microbiota in Pregnant Women. *Sci Rep* 2019; 9: 4463.
- Humbel F, Rieder JH, Franc Y, Juillerat P, Scharl M, Misselwitz B, et al. Cohort Study Group. Association of Alterations in Intestinal Microbiota with Impaired Psychological Function in Patients with Inflammatory Bowel Diseases in Remission. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2020; 18:2019-2029.
- Huo R, Zeng B, Zeng L, Cheng K, Li B, Luo Y, et al. Microbiota Modulate Anxiety-Like Behavior and Endocrine Abnormalities in Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; 7:489.
- Ianiro G, Tilg H, Gasbarrini A. Antibiotics as deep modulators of gut microbiota: between good and evil. *Gut* 2016; 65:11:1906–15.
- Jenior ML, Leslie JL, Young VB, Schloss PD. *Clostridium difficile* alters the structure and metabolism of distinct cecal microbiomes during initial infection to promote sustained colonization. *mSphere* 3 2018; e00261–18.
- Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology* 2010; 156:3216–3223.
- Jiang H, Ling Z, Zhang Y, Mao H, Ma Z, Yin Y, et al. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain Behavior and Immunity* 2015; 48:186–194.
- Jurburg SD, Cornelissen JJBWJ, Boer Pde, Smits MA, Rebel JMJ. Successional dynamics in the gut microbiome determine the success of *Clostridium difficile* infection in adult pig models. *Front Cell Infect Microbiol* 2019; 9:271.
- Khan I, Yasir M, Azhar EI, Kumosani T, Barbour EK, Bibi F, et al. Implication of GM in human health. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2014; 13:1325–1333.
- Knecht H, Neuling SC, Heinsen FA, Knecht C, Schilhabel A, Schmitz RA, Zimmermann A, et al. Effects of  $\beta$ -Lactam Antibiotics and Fluoroquinolones on Human Gut Microbiota in Relation to *Clostridium difficile* Associated Diarrhea. *PLoS One* 2014; 9:e89417.
- Kuribayashi H, Miyata M, Yamakawa H, Yoshinari K, Yamazoe Y. Enterobacteria-mediated deconjugation of taurocholic acid enhances ileal farnesoid X receptor signaling. *Eur J Pharmacol* 2012; 697:132–138.
- Kwon Hye-Joo, Mohammed AE, Eltom KH, Albrahim JS, Alburae NA. Evaluation of antibiotic-induced behavioral changes in mice. *Physiology & behavior* 2020; 223.
- Leclercq S, Matamoros S, Cani PD, Neyrinck AM, Jamar F, Stärkel P, et al. Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111: e4485-93.

- Leclercq S, Mian FM, Stanisz AM, Bindels LB, Cambier E, Ben-Amram A, et al. Low-dose penicillin in early life induces long-term changes in murine gut microbiota, brain cytokines and behavior. *Nat Commun.* 2017; 8: 15062.
- Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 1987; 92:180-185.
- Lurie I, Yang YX, Haynes K, Mamtani R, Boursi B. Antibiotic exposure and the risk for depression, anxiety, or psychosis: a nested case-control study. *The Journal of clinical psychiatry* 2015; 76:1522-1528.
- Maes M, Kubera M, Leunis JC, Berk M. Increased IgA and IgM responses against gut commensals in chronic depression: further evidence for increased bacterial translocation or leaky gut. *J Affect Disord* 2012; 141:55–62.
- Maier L, Goemans CV, Pruteanu M, Wirbe J, Kuhn M, et al. Dissecting the collateral damage of antibiotics on gut microbes. *bioRxiv* 2020;
- McGaughey KD, Yilmaz-Swenson T, Elsayed NM, et al. Relative abundance of *Akkermansia* spp. and other bacterial phylotypes correlates with anxiety- and depressive-like behavior following social defeat in mice. *Sci Rep* 2019; 9: 3281.
- Modi SR, Collins JJ, Relman DA. Antibiotics and the gut microbiota. *J Clin Invest* 2014; 124:4212–4218.
- Murphy M, Bradley CP, Byrne S. Antibiotic prescribing in primary care, adherence to guidelines and unnecessary prescribing - an Irish perspective. *BMC Fam Pract* 2012; 28:13:43.
- Naseribafrouei A, Hestad K, Avershina E, Sekelja M, Linlokken A, Wilson R, Rudi K. Correlation between the human fecal microbiota and depression. *Neurogastroenterol Motil* 2014; 26:1155–1162.
- Naumova N, Alikina T, Tupikin A, et al. Human Gut Microbiome Response to Short-Term Bifidobacterium-Based Probiotic Treatment. *Indian J Microbiol* 2020; 60:451–457.
- Noble EE, Hsu TM, Kanoski SE. Gut to Brain Dysbiosis: Mechanisms Linking Western Diet Consumption, the Microbiome, and Cognitive Impairment. *Frontiers in behavioral neuroscience* 2017; 11:9.
- O'Malley D, Julio-Pieper M, Gibney SM, Dinan TG, Cryan JF. Distinct alterations in colonic morphology and physiology in two rat models of enhanced stress-induced anxiety and depression-like behaviour. *Stress* 2010; 13:114-22.
- Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 2020;18: e3000410.

- Peter J, Fournier C, Durdevic M, Knoblich L, Keip B, Dejacó C, et al., Microbial Signature of Psychological Distress in Irritable Bowel Syndrome. *Psychosom Med* 2018; 80:698-709.
- Pietá CD, De Lima MNM, Presti-Torres J, Dornelles A, Garcia VA, Scalco FS, et al. Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. *Neuroscience* 2007; 146:1719-25.
- Ploeger GE, Spruijt BM, Cools AR. Effects of haloperidol on the acquisition of a spatial learning task. *Physiol Behav* 1992; 52:979-983.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 2013; 41: 590–596.
- Rashid MU, Zaura E, Buijs MJ, et al. Determining the long-term effect of antibiotic administration on the human normal intestinal microbiota using culture and pyrosequencing methods. *Clin Infect Dis* 2015; 60:77–84.
- Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *Peer J* 2016; 4:e2584.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied Environment Microbiology* 2009; 75:7537–41.
- Schmidtner AK, Slattery DA, Gläsner J, Hiergeist A, Gryksa K, Malik VA, et al. Minocycline alters behavior, microglia and the gut microbiome in a trait-anxiety-dependent manner. *Transl Psychiatry* 2019; 13:223.
- Segata N, Izard J, Waldron L, et al. Metagenomic biomarker Discovery and explanation. *Genome Biology* 2011;12: R60.
- Segura-Egea JJ, Gould K, Şen BH, et al. European Society of Endodontology position statement: the use of antibiotics in endodontics. *Int Endod J* 2018; 51:20-25.
- Stilling RM, Bordenstein SR, Dinan TG, Cryan JF. Friends with social benefits: host-microbe interactions as a driver of brain evolution and development?. *Front Cell Infect Microbiol* 2014; 4:147.
- Suchodolski JS, Markel ME, Garcia-Mazcorro JF, Unterer S, et al. The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS ONE* 2020; 7: e51907.
- Sun L, Zhang H, Cao Y, et al. Fluoxetine ameliorates dysbiosis in a depression model induced by chronic unpredicted mild stress in mice. *Int J Med Sci* 2019; 16:1260-1270.
- Tulstrup MV-L, Christensen EG, Carvalho V, Linnings C, Ahrné S, Højberg O, et al. Antibiotic Treatment Affects Intestinal Permeability and Gut Microbial Composition in Wistar Rats Dependent on Antibiotic Class. *PLoS ONE* 2015; 10: e0144854.

- Willians BL, Hornig M, Buie T, Bauman ML, Paik MC, et al. Lipkin Impaired carbohydrate digestion and transport and mucosal dysbiosis in the intestines of children with autism and gastrointestinal disturbances PLoS ONE 2011; 6: e24585.
- Yao J, Carter RA, Vuagniaux G, Barbier M, Rosch JW, Rock CO. A pathogenselective antibiotic minimizes disturbance to the microbiome. Antimicrob. Agents Chemother 2016; 60:4264–4273.
- Zhou Q, Zhang Y, Wang X, et al. Gut bacteria *Akkermansia* is associated with reduced risk of obesity: evidence from the American Gut Project. Nutr Metab 2020; 17:90.
- Zimmermann P, Curtis N. The effect of antibiotics on the composition of the intestinal microbiota - a systematic review. J Infect 2019; 79:471–489.
- Zoorob R, Sidani MA, Fremont RD, Kihlberg C. Antibiotic use in acute upper respiratory tract infections. Am Fam Physician 2012; 86:817-82.

## 5. CONCLUSÕES

Os efeitos das bactérias intestinais na função e no desenvolvimento do cérebro têm sido uma área de pesquisa ativa nos últimos anos. O uso de antibióticos pode alterar a diversidade bacteriana no intestino pois não são seletivos, atingindo também as bactérias comensais.

No presente trabalho a exposição de ratos Wistar, aos antimicrobianos amoxicilina e clindamicina por 3 dias, foi capaz de diminuir a carga microbiana nas fezes dos animais expostos imediatamente após o uso dos mesmos. Para os animais que receberam antimicrobianos por 7 dias, uma diminuição significativa no número de colônias bacterianas foi observada logo após a administração, permanecendo alterada mesmo após 30 dias de administração. No entanto, não houve diferença entre os grupos AC e CM.

Entretanto foi observado que os índices de diversidade alfa indicaram variações na riqueza, diversidade e equitabilidade em relação à exposição a AM ou CM. Mudanças composicionais a nível de gênero apresentaram diferenças estatisticamente significativa após 3 e 7 dias do uso dos antibióticos e se mantiveram alteradas após 30, 60 e 90 dias.

Os animais apresentaram um comportamento mais ansioso imediatamente após o uso de AC e AM quando avaliados no teste do labirinto em cruz elevado, entretanto quando submetidos ao teste de campo aberto não houve diferença estatisticamente significativa para os animais que usaram os antibióticos por 3 dias. Para os grupos de animais que usaram antibióticos por 7 dias o tempo no centro do aparelho mostrou-se significativamente menor. Quando submetidos ao teste de reconhecimento de objeto foi observado que o tratamento com os antibióticos diminuiu a capacidade dos ratos de explorar um novo objeto, quando avaliados imediatamente após o uso dos antibióticos.

Os antibióticos amoxicilina e clindamicina mesmo em doses baixas e em esquemas posológicos com uso por curto período demonstraram ser capazes de afetar significativamente a composição da microbiota intestinal, mesmo que haja um retorno no número de colônias anteriormente visualizadas. Este estudo mostrou que mesmo após 90 dias de uso dos antimicrobianos a sua composição não permanece a mesma, e conseqüentemente pode acarretar em manifestações no comportamento.

## 6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Arbolea S, Watkins C, Stanton C, Ross RP. Gut Bifidobacteria Populations in Human Health and Aging. *Front Microbiol* 2016; 19:1204.
- Association between Systemic Diseases and Apical Periodontitis. *Journal of Endodontics* 2016; 42: 1427-1434.
- Astbury S, Mostyn A, Symonds ME, Bell RC (2015). Nutrient availability, the microbiome, and intestinal transport during pregnancy. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism* 2015; 40: 1100–1106.
- Bascones MA, Aguirre UJM, Bermejo FA, Blanco CA, Gay-Escoda C, González-Moles MA, et al. Consensus statement on antimicrobial treatment of odontogenic bacterial infections. *Med oral Patol Oral Cir Bucal* 2004; 9:363-376.
- Bercik P, Denou E, Collins J, Jackson W, Lu J, Jury J, et al. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. *Gastroenterology* 2011; 141:599-609.
- Binyamin D, Werbner N, Nuriel-Ohayon M, Uzan A, Mor H, Abbas A, et al. The aging mouse microbiome has obesogenic characteristics. *Genome* 2020; 12:87.
- Brooks SP, McAllister M, Sandoz M, Kalmokoff ML. Culture-independent phylogenetic analysis of the faecal flora of the rat. *Can J Microbiol* 2003; 49:589-601.
- Brown KA, Khanafer N, Daneman N, Fisman DN. Meta-analysis of antibiotics and the risk of community-associated *Clostridium difficile* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:2326-32.
- Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* 2012; 13:260-270.
- Collins J, Borojevic R, Verdu EF, Huizinga JD, Ratcliffe EM. Intestinal microbiota influence the early postnatal development of the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2014; 26:98–107.
- Collins SM, Surette M, Bercik P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10:735-42.
- Coppo R. The gut-kidney axis in IgA nephropathy: role of microbiota and diet on genetic predisposition. *Pediatr Nephrol* 2018; 33:53-61.
- Cox LM, Yamanishi S, Sohn J, Alekseyenko AV, Leung JM, Cho I, et al. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell* 2014; 158:705-721.
- Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:4554-61.
- Di Caprio JM, Rantz LA. Effects of Terramycin on the bacterial flora of the bowel in man. *AMA Arch Intern Med* 1950; 86:649–57.
- Dinan TG, Cryan JF. Melancholic microbes: a link between gut microbiota and depression? *Neurogastroenterol Motil* 2013; 25:713–719.

- El Aidy S, Dinan TG, Cryan JF. Gut Microbiota: The Conductor in the Orchestra of Immune-Neuroendocrine Communication. *Clin Ther* 2015; 37:954-67.
- Falsey AR, McElhaney JE, Beran J, van Essen GA, Duval X, Esen M, et al. Respiratory Syncytial Virus and Other Respiratory Viral Infections in Older Adults With Moderate to Severe Influenza-like Illness. *The Journal of Infectious Diseases* 2014; 209:1873-1881.
- Fleming A. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* 1929; 10:226-236.
- Fouhy F, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C, Cotter PD. Composition of the early intestinal microbiota: knowledge, knowledge gaps and the use of high-throughput sequencing to address these gaps. *Gut Microbes* 2012; 3:203-220.
- Franzosa EA, Sirota-Madi A, Avila-Pacheco J, Fornelos N, Haiser HJ, Reinker S, et al. Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease. *Nat Microbiol* 2019; 4:293-305.
- Fröhlich EE, Farzi A, Mayerhofer R, Reichmann F, Jačan A, Wagner B, et al. Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota-brain communication. *Brain Behav Immun* 2016; 56:140-55.
- Fuchs FD, Wannmcher L, Ferreira MBC. *Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional*. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 1074p. (a)369-372p.
- Gaman A, Kuo B. Neuromodulatory processes of the brain-gut axis. *Neuromodulation* 2008; 11:249-259.
- Gareau MG, Wine E, Rodrigues DM, Cho JH, Whary MT, Philpott DJ, et al. Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. *Gut* 2011; 60:307-17.
- Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006; 312:1355-1359.
- Gordon JI, Dewey KG, Mills DA, Medzhitov RM. The human gut microbiota and undernutrition. *Sci Transl Med* 2012; 4:137.
- Grenham S, Clarke G, Cryan JF, Dinan TG. Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Front Physiol* 2011; 2:94.
- Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361:512-9.
- Guida F, Turco F, Iannotta M, De Gregorio D, Palumbo I, Sarnelli G, et al. Antibiotic-induced microbiota perturbation causes gut endocannabinoidome changes, hippocampal neuroglial reorganization and depression in mice. *Brain Behav Immun* 2018; 67:230-245.
- Guimarães DO, Momesso LS, Pupo MT. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova* 2010; 3:667-679.
- Haroon E, Raison CL, Miller AH. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology* 2012; 37:137.
- Hawrelak JA, Myers SP. The causes of intestinal dysbiosis: a review. *Altern Med Rev* 2004; 9:180-97.



- Hoban AE, Moloney RD, Golubeva AV, McVey Neufeld KA, O'Sullivan O, Patterson E, et al. Behavioural and neurochemical consequences of chronic gut microbiota depletion during adulthood in the rat. *Neuroscience* 2016; 339:463-477.
- Hollister EB, Gao C, Versalovic J. Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology*. 2014; 146:1449-1458.
- Indrio F, Riezzo G, Raimondi F, Di Mauro A, Francavilla, R. Microbiota involvement in the Gut-Brain axis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2013; 57:11-15.
- Isanaka S, Langendorf C, Berthé F, Gnegme S, Li N, Ousmane N, et al: Routine amoxicillin for uncomplicated severe acute malnutrition in children. *N Engl J Med* 2016; 374:444–453.
- Jakobsson HE, Jernberg C, Andersson AF, Sjölund-Karlsson M, Jansson JK, Engstrand L. Short-Term Antibiotic Treatment Has Differing Long-Term Impacts on the Human Throat and Gut Microbiome. *PLoS ONE* 2010; 5e9836.
- Jang HM, Lee HJ, Jang SE, Han MJ, Kim DH. Evidence for interplay among antibacterial-induced gut microbiota disturbance, neuro-inflammation, and anxiety in mice. *Mucosal Immunol* 2018; 11:1386–1397.
- Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology (Reading)*. 2010; 156:3216-3223.
- Kaelberer MM, Buchanan KL, Klein ME, Barth BB, Montoya MM, Shen X, Bohórquez DV. A gut-brain neural circuit for nutrient sensory transduction. *Science* 2018; 156:3216-3223.
- Katz L, Baltz RH. Natural product discovery: past, present, and future. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2016; 43:155-76.
- Kaur K, Fayad R, Saxena A, Frizzell N, Chanda A, Das S, et al. Southern Network on Adverse Reactions (SONAR) project. Fluoroquinolone-related neuropsychiatric and mitochondrial toxicity: a collaborative investigation by scientists and members of a social network. *J Community Support Oncol* 2016; 14:54-65.
- Khalighinejad N, Aminoshariae MR, Aminoshariae A, Kulild JC, Mickel A, Fouad AF.
- Kim SK, Guevarra RB, Kim YT, Kwon J, Kim H, Cho JH, et al. Role of Probiotics in Human Gut Microbiome-Associated Diseases. *J Microbiol Biotechnol* 2019; 29:1335-1340.
- Kundu P, Blacher E, Elinav E, Pettersson S. Our Gut Microbiome: The Evolving Inner Self. *Cell* 2017; 171:1481-1493.
- Kundu P, Lee HU, Garcia-Perez I, Tay EXY, Kim H, Faylon LE, et al. Neurogenesis and longevity signaling in young germ-free mice transplanted with the gut microbiota of old mice. *Sci Transl Med* 2019; 11:518.
- Lapin B, Piorkowski J, Ownby D, Freels S, Chavez N, Hernandez E, et al. Relationship between prenatal antibiotic use and asthma in at-risk children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2015; 114:203–207.
- Leclercq S, Mian FM, Stanisz AM, Bindels LB, Cambier E, Ben-Amram A, et al. Low-dose penicillin in early life induces long-term changes in murine gut microbiota, brain cytokines and behavior. *Nat Commun* 2017; 8: 15062.


- Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey R, Bircher JS. Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. *Science* 2008; 320:1647 – 1651.
- Li K, Bihan M, Yooseph S, Methé BA. Analyses of the microbial diversity across the human microbiome. *PLoS One* 2012;7e32118.
- Luczynski P, McVey Neufeld KA, Oriach CS, Clarke G, Dinan TG, Cryan JF. Growing up in a Bubble: Using Germ-Free Animals to Assess the Influence of the Gut Microbiota on Brain and Behavior. *Int J Neuropsychopharmacol* 2016;19(8).
- Lurie I, Yang YX, Haynes K, Mamtani R, Boursi B. Antibiotic exposure and the risk for depression, anxiety, or psychosis: a nested case-control study. *The Journal of clinical psychiatry* 2015; 76:1522-1528.
- Maier SF, Watkins LR. Bidirectional communication between the brain and the immune system: Implications for behaviour. *Animal Behaviour* 1999; 57:741–75.
- Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 2015; 31.
- Mayer E. Gut feelings: the emerging biology of gut–brain communication. *Nat Rev Neurosci* 2011; 12:453–466.
- Ministério da Saúde. Portaria nº. 2.616 de 12 de maio de 1998. Dispõe sobre controle de infecções hospitalares. Brasília: Diário Oficial da União; 1998.
- Möhle L, Mattei D, Heimesaat MM, Bereswill S, Fischer A, Alutis M, et al. Ly6C(hi) Monocytes Provide a Link between Antibiotic-Induced Changes in Gut Microbiota and Adult Hippocampal Neurogenesis. *Cell Rep* 2016; 31: 1945-56.
- Mondot S, Lepage P, Seksik P, Allez M, Tréton X, Bouhnik Y, et al. GETAID. Structural robustness of the gut mucosal microbiota is associated with Crohn's disease remission after surgery. *Gut* 2016; 65:954-62.
- Morgan XC, Segata N, Huttenhower C. Biodiversity and functional genomics in the human microbiome. *Trends Genet* 2013; 29:51-58.
- Murk W, Risnes KR, Bracken MB. Prenatal or early-life exposure to antibiotics and risk of childhood asthma: a systematic review. *Pediatrics* 2011; 127:1125-38.
- O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 2006; 7:688-693.
- Palleja A, Mikkelsen KH, Forslund SK, Kashani A, Allin KH, Nielsen T, et al. Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. *Nat Microbiol* 2018; 3:1255-1265.
- Passos MCF, Moraes-Filho JP. Intestinal microbiota in digestive diseases. *Arquivos de Gastroenterologia*, 2017; 54:255–262.
- Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res* 2009; 19: 2317–2323.
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdor KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464:59–65.
- Rashid MU, Zaura E, Buijs MJ, Keijser BJ, Crielaard W, Nord CE, Weintraub A. Determining the Long-term Effect of Antibiotic Administration on the Human Normal

- Intestinal Microbiota Using Culture and Pyrosequencing Methods. *Clin Infect Dis* 2015; 60:77-84.
- Rhee SH, Pothoulakis C, Mayer EA. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 6:306-14.
- Schaad UB, Esposito S, Razi CH. Diagnosis and Management of Recurrent Respiratory Tract Infections in Children: A Practical Guide. *Arch Pediatr Infect Dis* 2016; 4e31039.
- Segura-Egea JJ, Martín-González J, Jiménez-Sánchez MDC, Crespo-Gallardo I, Saúco-Márquez JJ, Velasco-Ortega E. Worldwide pattern of antibiotic prescription in endodontic infections. *Int Dent J* 2017; 67:197-205.
- Segura-Egea JJ, Velasco-Ortega E, Torres-Lagares D, Velasco-Ponferrada MC, Monsalve-Guil L, Llamas-Carreras JM. Pattern of antibiotic prescription in the management of endodontic infections amongst Spanish oral surgeons. *Int Endod J* 2010; 43:342-50.
- Sharon G, Sampson TR, Geschwind DH, Mazmanian SK. The Central Nervous System and the Gut Microbiome. *Cell* 2016; 167:915-32.
- Sherwin E, Rea K, Dinan TG, Cryan JF. A gut (microbiome) feeling about the brain. *Curr Opin Gastroenterol* 2016; 32:96-102.
- Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L. Health Care Infection Control Practices Advisory Committee. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings. *Am J Infect Control* 2007; 35:65-164.
- Silverman JD, Washburne AD, Mukherjee S, David LA. A phylogenetic transform enhances analysis of compositional microbiota data. *Elife* 2017; 6:e21887.
- Stilling RM, Dinan TG, Cryan JF. Microbial genes, brain & behaviour - epigenetic regulation of the gut-brain axis. *Genes Brain Behav* 2014; 13:69-86.
- Suarez C, Gudiol F. Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica* 2009; 27:116-129.
- Sweeney TE, Morton JM. The human gut microbiome: a review of the effect of obesity and surgically induced weight loss. *JAMA Surg.* 2013; 148:563-9.
- Tlaskalová-Hogenová H, Štěpánková R, Kozáková H, et al. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell Mol Immunol* 2011; 8:110–120.
- Tonkin-Crine S, Anthierens S, Hood K, Yardley L, Cals JW, Francis NA, et al. Discrepancies between qualitative and quantitative evaluation of randomised controlled trial results: achieving clarity through mixed methods triangulation. *Implementation Sci* 2016; 11:66.
- World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva: World Health Organization; 2018
- Wunsche L, Bruggemann L, Wolfgang B. Determination of substrate utilization patterns of soil microbial communities: an approach to assess population changes after hydrocarbon pollution. *FEMS Microbiol Ecol* 1995; 17:295-306.

- Yano JM, Yu K, Donaldson GP, Shastri GG, Ann P, Ma L, Nagler CR, et al. Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis. *Cell* 2015; 161:264–276.
- Yoon MY, Yoon SS. Disruption of the Gut Ecosystem by Antibiotics. *Yonsei Med J* 2018; 59:4-12.
- Zaura E, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiol* 2009; 9:259.
- Zhang W, Li J, Lu S, Han N, Miao J, Zhang T. Gut microbiota community characteristics and disease-related microorganism pattern in a population of healthy Chinese people. *Sci* 2019; 9:1594.
- Zhang YJ, Li S, Gan RY, Zhou T, Xu DP, Li HB. Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *Int J Mol Sci* 2015; 16:7493-519.
- Zoorob R, Sidani MA, FremontRD, Kihlberg C. Antibiotic use in acute upper respiratory tract infections. *Am Fam Physician* 2012; 86:817-82.

## 7. ANEXOS

### ANEXO 1 - PARECER DE APROVAÇÃO DA CEUA-PUCRS



**SIPESQ**  
Sistema de Pesquisas da PUCRS

---

Código SIPESQ: 8961 Porto Alegre, 2 de outubro de 2018

Prezado(s) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "EFEITO DO TEMPO DE UTILIZAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS PRESCRITOS PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES ODONTOGÊNICAS NO COMPORTAMENTO E NO MICROBIOMA ORAL E INTESTINAL ESTUDO EM MODELO ANIMAL" coordenado por MARIA MARTHA CAMPOS.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Duração do Projeto: 02/10/2018 - 02/07/2019

Nº de Animais	Espécie
42	Rattus norvegicus
Total de Animais: 42	

Atenciosamente,  
Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA)

## ANEXO 2 – PARECER DE APROVAÇÃO PELA COMPESQ-ICBS-UFRGS

Sistema Pesquisa - Pesquisador: Francisco Montagner			
<b>Dados Gerais:</b>	<b>Projeto Nº:</b>	<b>Título:</b>	
	35584	EFEITO DO TEMPO DE UTILIZAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS PRESSCRITOS PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES ODONTOGÊNICAS NO COMPORTAMENTO E NO MICROBIOMA ORAL E INTESTINAL. 7 ESTUDO EM MODELO ANIMAL	
	<b>Área de conhecimento:</b>	<b>Início:</b>	<b>Previsão de conclusão:</b>
	Farmacologia	01/10/2018	30/07/2019
	<b>Situação:</b>	<b>Projeto Isolado com linha temática:</b> Farmacologia da Infecção	
	Projeto em Andamento		
	<b>Origem:</b>	Instituto de Ciências Básicas da Saúde Programa de Pós-Graduação em Ciência Biológicas: Farmacologia e Toxicológica	
	<b>Local de Realização:</b>	não informado	
	<b>Não apresenta relação com Patrimônio Genético ou Conhecimento Tradicional Associado.</b>		
	<b>Objetivo:</b>	O objetivo geral do estudo será avaliar o efeito do uso de agentes antimicrobianos na diversidade e na estrutura dos microbiomas bucal e intestinal, além das possíveis alterações de comportamento em ratos Wistar.	
<b>Palavras Chave:</b>	ANTIMICROBIANOS, MICROBIOMA, INFECÇÕES DENTAIS		
<b>Equipe UFRGS:</b>	<b>Nome:</b> FRANCISCO MONTAGNER <b>Coordenador - Início:</b> 01/10/2018 <b>Previsão de término:</b> 30/07/2019 <b>Nome:</b> CLARISSA CAVILLOTTI FATTI PAPELO <b>Coordenadora - Início:</b> 01/10/2018 <b>Previsão de término:</b> 30/07/2019 <b>Nome:</b> Rafaela Alves Arco <b>Coordenadora - Início:</b> 01/10/2018 <b>Previsão de término:</b> 30/07/2019 <b>Outra:</b> Aluno de Doutorado - Início: 01/10/2018 Previsão de término: 30/07/2019		
<b>Equipe Externa:</b>	<b>Nome:</b> Regina Ilacqua Campos <b>Coordenadora - Início:</b> 01/10/2018 <b>Coordenador desde:</b> 01/10/2018		
<b>Avaliações:</b>	<b>Comissão de Pesquisa de Ciências Básicas da Saúde - Aprovado em:</b> 04/07/2018 <b>Clique aqui para visualizar o parecer</b> <b>Comissão de Ética no Uso de Animais - Arquivado em:</b> 10/06/2018 <b>Clique aqui para visualizar o parecer</b>		
<b>Atos:</b>	<b>Projeto Concedido</b> <b>Documento de Aprovação</b> <b>Formulário de Encaminhamento de Protocolo de Pesquisa com Animais</b> <b>Outros</b> <b>Outros</b> <b>Outros</b> <b>Outros</b>		
	<b>Data de Envio:</b>	03/07/2018	
	<b>Data de Envio:</b>	03/07/2018	
	<b>Data de Envio:</b>	03/07/2018	
	<b>Data de Envio:</b>	03/07/2018	
	<b>Data de Envio:</b>	03/07/2018	
	<b>Data de Envio:</b>	03/07/2018	



**ANEXO 3 – PARECER DE ENVIO A CEUA-UFRGS COM INDICAÇÃO DE ENCAMINHAMENTO À CEUA-PUCRS, INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZA A ETAPA EXPERIMENTAL ENVOLVENDO ANIMAIS.**

Trata-se de um projeto de pesquisa vinculado ao doutorado de uma aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica/ UFRGS, tendo como linha temática Farmacologia da Infecção. Título: EFEITO DO TEMPO DE UTILIZAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS PRESCRITOS PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES ODONTOGÊNICAS NO COMPORTAMENTO E NO MICROBIOMA ORAL E INTESTINAL - ESTUDO EM MODELO ANIMAL. Este projeto será realizado em três locais: Biotério do Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CEMBE) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Bucal, da Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Laboratório de Geobiologia, do Instituto do Petróleo e Recursos Naturais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Tendo em vista que o desenvolvimento da parte experimental do projeto de pesquisa intitulado: Efeito do tempo de utilização de antimicrobianos prescritos para o tratamento de infecções odontogênicas no comportamento e no microbioma oral e intestinal - Estudo em Modelo Animal, que envolve a utilização de animais (ratos Wistar (*Rattus norvegicus*)) será desenvolvido no âmbito da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, cabe a CEUA - PUC a sua análise e aprovação. Com isso, o referido projeto ficará arquivado na CEUA- UFRGS.

## ANEXO 4 – CADASTRO NO SISTEMA DE GERENCIAMENTO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO (SISGEN).



Ministério do Meio Ambiente  
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A425474

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	<b>A425474</b>
Usuário:	<b>UFRGS</b>
CPF/CNPJ:	<b>92.969.856/0001-98</b>
Objeto do Acesso:	<b>Patrimônio Genético</b>
Finalidade do Acesso:	<b>Pesquisa</b>

### Espécie

Impossibilidade de identificação  
Impossibilidade de identificação  
Impossibilidade de identificação  
Impossibilidade de identificação  
Impossibilidade de identificação  
Impossibilidade de identificação  
Impossibilidade de identificação  
Impossibilidade de identificação  
Impossibilidade de identificação  
Impossibilidade de identificação  
Impossibilidade de identificação  
Impossibilidade de identificação



**Impossibilidade de identificação**

Título da Atividade: **Efeito do tempo de utilização de antimicrobianos prescritos para o tratamento de infecções odontogênicas no comportamento e no microbioma oral e intestinal – estudo em modelo animal**

**Equipe**

Francisco Montagner	UFRGS
Maria Martha Campos	PUCRS
Rafaela Alves Arcanjo	UFRGS

**Parceiras Nacionais**

88.630.413/0001-09 / União Brasileira de Educação e Assistência

Data do Cadastro: **18/10/2018 09:15:15**

Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **9:15** de **18/10/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
ASSOCIADO - **SISGEN**