

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento

Guilherme Rodriguez Amando

**AVALIAÇÃO DA OSCILAÇÃO CIRCADIANA DA MICROBIOTA INTESTINAL  
CULTIVÁVEL EM RATOS WISTAR MACHO**

Porto Alegre, 2023

Guilherme Rodriguez Amando

**AVALIAÇÃO DA OSCILAÇÃO CIRCADIANA DO MICROBIOMA INTESTINAL  
EM RATOS WISTAR MACHO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Psiquiatria e Ciências do Comportamento, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Paz Loayza Hidalgo  
Coorientador: Prof Dr Francisco Montagner

Porto Alegre, 2023

### CIP - Catalogação na Publicação

Amando, Guilherme Rodriguez  
AVALIAÇÃO DA OSCILAÇÃO CIRCADIANA DA MICROBIOTA  
INTESTINAL CULTIVÁVEL EM RATOS WISTAR MACHO /  
Guilherme Rodriguez Amando. -- 2023.  
62 f.  
Orientadora: Maria Paz Loayza Hidalgo.

Coorientadora: Francisco Montagner.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Psiquiatria e Ciências do  
Comportamento, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. microbiologia. 2. ritmos circadianos. 3. ciclo  
claro-escuro. 4. bactérias anaeróbias. 5. fungos. I.  
Hidalgo, Maria Paz Loayza, orient. II. Montagner,  
Francisco, coorient. III. Título.

## Agradecimentos

À minha família, que sempre estiveram presentes em todas as etapas importantes da minha vida me apoiando incondicionalmente, minha mãe, meus dois pais e meus dois irmãos. Não foi fácil chegar até aqui e, com certeza, eu não teria conseguido sozinho. Mesmo que eu não seja o melhor em dizer o quanto vocês significam para mim, quero que vocês saibam que eu sou muito grato por tudo. Te amo família <3

À minha companheira Raíne da Silva de Brito, a *bituca*, que apareceu na minha vida quando eu menos esperava. Agora, não sei se consigo não esperar que ela esteja comigo nos próximos anos. Mesmo “sem querer”, ela me impulsiona a ser alguém melhor e a entender que é possível conseguir reconhecer e celebrar nossos feitos e realizações. Com ela, também ganhei três seres incríveis e que eu gosto muito, a Susi, o Cristiano e a Cyndi. Amo vocês!

À Maria Paz Loayza Hidalgo, uma mulher incrível e cientista extraordinária que me incentiva a ser uma pessoa e profissional melhor diariamente. Tenho o privilégio de poder chamar de orientadora esta pessoa que admiro tanto! Ao meu coorientador Francisco Montagner, agradeço por todo o companheirismo, disponibilidade, paciência para me ensinar, por confiar em mim e por ter me apresentado uma possibilidade de estudo e tópicos incríveis na ciência. É sempre um prazer enorme trabalhar contigo!

A todos os colegas e pesquisadores incríveis do Laboratório de Cronobiologia e Sono que sempre estiveram presentes e que contribuíram imensamente para minha formação. Um agradecimento especial para estes que participaram do meu projeto de mestrado, André e Débora, que, além de inspirações e modelos a serem seguidos como profissionais e cientistas, são grandes amigos que pretendo manter na minha vida por muito tempo! Também, as “Anas”, Luli, Manu, Mel e a Chefa (aka Nicoli) por também serem amizades incríveis e por terem me ensinado tanto nestes 6 anos como pesquisador. O apoio e companhia de vocês foi e é extremamente importante para mim!

À equipe da Unidade de Experimentação Animal do HCPA, por toda a estrutura fornecida e ensinamentos durante não só estes experimentos, mas por tantos outros durante os últimos anos. Ao PPG em Psiquiatria e Ciências do Comportamento da UFRGS, por possibilitar a realização do meu mestrado. Aos órgãos de fomento FIPE/HCPA, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro e concessão de bolsas para que pudéssemos desenvolver este (e muitos outros) projetos em nosso Laboratório.

A todos os amigos, colegas e familiares que não foram contemplados aqui, mas que contribuíram substancialmente para minha formação e fizeram parte da minha vida, agradeço a tudo que fizeram por mim. Muito obrigado!

## RESUMO

**Relevância:** O intestino de mamíferos possui populações microbianas abundantes, com grande diversidade taxonômica e que sofre influência de diversos processos no organismo. Um dos fatores que influenciam este microbioma são variações no ciclo claro-escuro. Novas publicações, utilizando metagenômica, sugerem que a luz possui uma importante função na constituição de comunidades microbianas, apresentando variações em sua abundância, de forma circadiana. Entretanto, este método molecular não distingue microorganismos viáveis de não viáveis. Estudos que avaliem esta variação utilizando métodos que quantifiquem microorganismos metabolicamente ativos (e.g, cultura microbiana) são escassos. **Objetivo:** Compreender a oscilação circadiana do microbioma intestinal de ratos Wistar macho através de análise de cultura microbiana de diferentes tecidos do trato gastrointestinal (i.e., ceco e reto) e fezes. **Métodos:** Durante um período de 24h, 3 animais foram eutanasiados, a cada 6 horas (n = 12), sendo o *zeitgeber time* zero (marcador de passagem de tempo; ZT0) correspondendo às 7 horas da manhã. Imediatamente após a eutanásia, foi feita a dissecação dos segmentos intestinais. Para possibilitar o plaqueamento nos meios de cultura (i.e., *Brain Heart Infusion Agar/BHI*, *Mitis Salivarius Agar/MS*, *Sabouraud Agar/SA* e *Brucella Agar/BA*), todas as amostras foram diluídas em tampão fosfato-salino (PBS). Os meios foram armazenados em condições gasosas com diferentes tensões de oxigênio/nitrogênio e em temperaturas específicas (entre 26°C e 37°C, dependendo do meio de cultura) para possibilitar o cultivo microbiano. Então, realizou-se a contagem de Unidades Formadoras de Colônia por ml (UFC/ml). As análises estatísticas foram feitas utilizando o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn. **Resultados:** No meio *Brucella*, a contagem de UFC/ml nas fezes foi significativamente maior no ZT0, seguido dos ZT6, ZT18 e ZT12 ( $p = 0,0156$ ). Em relação aos meios de cultura, nas amostras do meio BHI, foram contadas mais UFC/ml em fezes (FZ) do que em ceco (CE) e mais em ceco do que em reto (RT) no ZT6 ( $p = 0,0321$ ) e no ZT12 ( $p = 0,0036$ ). Nos meios *Sabouraud* ( $p = 0,0214$ ) e *Mitis Salivarius* ( $p = 0,0107$ ), foi observado o mesmo padrão (i.e., FZ>CE>RT) no ZT0. **Conclusões:** Nós demonstramos que, a cada 6 horas, é possível observar variação nas contagens de UFC pelo método de cultura microbiana, abrangendo a oscilação diurna de bactérias anaeróbias metabolicamente ativas. Além desta variação nos horários avaliados, também foram apresentadas diferenças quantitativas de comunidades em diferentes tecidos. Estudos futuros devem ser realizados objetivando a complementaridade de métodos moleculares e culturas microbianas, visando um melhor entendimento mecanístico e fisiológico do microbioma intestinal. **Apoio Financeiro:** FIPE/HCPA, CNPq, CAPES, FAPERGS.

**Palavras-chave:** microbiologia; ritmos circadianos; ciclo claro-escuro; bactérias anaeróbias; fungos.

## ABSTRACT

**Relevance:** The intestine of mammals has abundant microbial populations, with great taxonomic diversity and which is influenced by several processes in the organism. One of the factors that influence this microbiome is variations in the light-dark cycle. New studies, using metagenomics, suggest that light plays an important role in the constitution of microbial communities, with variations in its abundance, in a circadian way. However, this molecular method does not distinguish viable from non-viable microorganisms. Studies that evaluate this variation utilizing methods to quantify metabolically active microorganisms (e.g, microbial culture) are scarce. **Objective:** To understand the circadian oscillation of the gut microbiome of male Wistar rats through analysis of the microbial culture of different tissues of the gastrointestinal tract (i.e., cecum and rectum) and feces. **Methods:** During a 24h period, three animals were euthanized, every 6 hours ( $n = 12$ ), with *zeitgeber time* zero (time pass marker; ZT) corresponding to 7 am. Immediately after euthanasia, the intestinal segments were dissected. To enable plating in the culture media (i.e., Brain Heart Infusion Agar/BHI, Mitis Salivarius Agar/MS, Sabouraud Agar/SA, and Brucella Agar/BA), all samples were diluted in phosphate buffered saline (PBS). The media were stored in gaseous conditions with different tensions of oxygen/nitrogen and at specific temperatures (between 26°C e 37°C, depending on the culture medium) to enable microbial cultivation. Then, the Colony Forming Units per ml (CFU/ml) count was performed. Statistical analyzes were performed using the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's multiple comparison test. In the Brucella medium, the CFU/ml count in feces was significantly higher in ZT0, followed by ZT6, ZT18 and ZT12 ( $p = 0.0156$ ). **Results:** Regarding the culture media, in the BHI samples, more CFU/ml was counted more in feces (FZ) than in cecum (CE) and more in cecum than in rectum (RT) in ZT6 ( $p = 0.0321$ ) and in the ZT12 ( $p = 0.0036$ ). In Sabouraud ( $p = 0.0214$ ) and Mitis Salivarius ( $p = 0.0107$ ), the same pattern (i.e., FZ > CE > RT) was observed in ZT0. **Conclusion:** We demonstrated that every 6 hours, it is possible to observe variation in CFU counts by the microbial culture method, covering the daytime oscillation of metabolically active anaerobic bacteria. In addition to this variation in the evaluated times, quantitative differences in communities in different tissues were also presented. Future studies should be carried out focusing on the complementarity of molecular methods and microbial cultures, aiming at a better mechanistic and physiological understanding of the intestinal microbiome. **Financial support:** FIPE/HCPA, CNPq, CAPES.

**Keywords:** microbiology; circadian rhythm; light-dark cycle; anaerobic bacteria; fungi

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES DA REVISÃO DA LITERATURA

<b>Figura 1.</b> Tipos de microrganismos e sua relação com o hospedeiro .....	14
<b>Figura 2.</b> O microbioma humano .....	16
<b>Figura 3.</b> Maquinário molecular dos ritmos biológicos .....	19
<b>Figura 4.</b> A relação bidirecional entre a microbiota intestinal e seu hospedeiro .....	22



## LISTA DE ABREVIATURAS EM PORTUGUÊS

5-HT	5-hidroxitriptamina / Serotonina
AANAT	Arilalkilamina N-Acetiltransferase
HPA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
HIOMT	Hydroxyindol-O-metiltransferase
NAS	n-acetil-serotonina
NSQ	Núcleo Supraquiasmático
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervoso Entérico
TGI	Trato gastrointestinal

## LISTA DE ABREVIATURAS EM INGLÊS

5-HT	5-hydroxytryptamine/ Serotonin
AANAT	n-acetyl-transferase
HPA	Hypothalamus-Pituitary-Adrenal
HIOMT	Hydroxyindole-O-methyltransferase
NAS	n-acetyl-serotonin
SQN	Suprachiasmatic Nucleus
CNS	Central Nervous System
ENC	Enteric Nervous System
GIT	Gastrointestinal Tract

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	11
<b>2. Revisão da literatura</b> .....	14
2.1. Microbiota e simbiose .....	14
2.2. Ritmos biológicos e organização temporal .....	18
2.3. Cronodisrupção, microbiota intestinal e eixo cérebro-intestino .....	21
<b>3. Justificativa</b> .....	25
<b>4. Hipótese</b> .....	26
<b>5. Objetivos</b> .....	27
5.1 Objetivos Gerais .....	27
5.2 Objetivos Específicos .....	27
<b>6. Artigo</b> .....	28
<b>7. Conclusões e Considerações Finais</b> .....	48
<b>8. Referências Bibliográficas</b> .....	49
<b>Anexo A - Carta de aprovação do projeto pelo CEUA/HCPA</b> .....	58
<b>Anexo B - Comprovante de publicação do artigo pela revista <i>Life</i></b> .....	59

## 1. Introdução

O sistema circadiano fornece ritmicidade a vários processos fisiológicos dos seres vivos (e.g., secreção hormonal, temperatura) e é sincronizado por pistas temporais fornecidas pelo ambiente (i.e., pistas externas de temporalidade). Ritmos diários de, aproximadamente, 24 horas são chamados de ritmos circadianos, termo cunhado por Franz Halberg em 1969 como *circadian* (do latim, *circā* - “cerca de” + *diēs* - “um dia”; (HALBERG; PETERSON; SILBER, 1959; HALBERG, 1969; CORNELISSEN *et al.*, 2013). A sincronização do sistema circadiano (i.e., ritmos endógenos) com as pistas ambientais é fundamental para a manutenção da saúde de forma geral (ASCHOFF, 1960, 1965; WELSH; TAKAHASHI; KAY, 2010). Esta sincronização ocorre, em sua maioria, pela luz, o principal *zeitgeber* (“doador de tempo”, em alemão; pista temporal que reflete na passagem de tempo; ASCHOFF, 1960, 1965). O desalinhamento dos ritmos endógenos com as pistas temporais exógenas é frequentemente associado com transtornos psiquiátricos, metabólicos e gastrointestinais (ERREN; REITER, 2009; RÜGER; SCHEER, 2009; JAGANNATH; PEIRSON; FOSTER, 2013). Além disso, estudos recentes observaram que a dessincronização de ritmos também parece afetar populações microbianas no intestino, demonstrando uma possível associação entre a microbiota intestinal e ritmos circadianos (THAISS *et al.*, 2014, 2016; VOIGT *et al.*, 2014; VOIGT, R. M. *et al.*, 2016).

O ser humano hospeda variadas populações microbianas em diversos sítios de seu corpo. Uma comunidade de microrganismos, independentemente do local em que reside, é chamada de microbiota (CRESCI; BAWDEN, 2015). Dentre as microbiotas, uma das principais é a intestinal, onde estima-se que  $10^{14}$  microrganismos a integram, fazendo deste o maior local do corpo com diferentes espécies de procariotos (DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2016; KODUKULA *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2017). Concomitante a isto, a distinta biogeografia do trato gastrointestinal (TGI) permite diferentes características ao longo desse trato, desempenhando um papel crítico na manutenção da homeostase fisiológica do hospedeiro (DETHLEFSEN; MCFALL-NGAI; RELMAN, 2007; CHUNG; KASPER, 2010). As diferentes regiões anatômicas do trato digestivo têm diferentes condições físico-químicas específicas de nicho, como taxa de fluxo intestinal, potencial redox, concentração de oxigênio, disponibilidade de nutrientes, resposta imune do hospedeiro e estratificação espacial desta estrutura (METCALF *et al.*, 1987; HE *et al.*, 1999; KOROPATKIN; CAMERON; MARTENS, 2012).

A microbiota intestinal é influenciada por diversos fatores. Estudos experimentais recentes com roedores demonstram que, quando submetidos a uma dieta hipercalórica ou quando administrado antibióticos periodicamente, as populações microbianas intestinais sofreram alterações significativas (LEONE *et al.*, 2015; THAISS *et al.*, 2016). Outros estudos apontam um possível papel da microbiota intestinal associada a obesidade (YIN *et al.*, 2018) e comportamentos tipo-depressivo-ansioso (FOSTER; MCVEY NEUFELD, 2013; YANG *et al.*, 2017). Adicionalmente, modelos experimentais reforçam que a composição da microbiota intestinal apresenta variação circadiana do ciclo claro-escuro, mudando sua conformação ao longo do dia (VOIGT *et al.*, 2014; PAULOSE *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2018). Logo, observa-se que um dos fatores essenciais nesse processo de oscilação da microbiota é a variação de ciclos claro-escuro (VOIGT, R. M. *et al.*, 2016; KHALYFA *et al.*, 2017; DEEVER; EUM; TOBOREK, 2018). Além disso, estudos recentes indicam um importante papel da melatonina produzida centralmente (i.e., glândula pineal) com variações na composição destes microambientes (PAULOSE *et al.*, 2016; PARKAR; KALSBECK; CHEESEMAN, 2019).

Diferentes são as abordagens para a caracterização da microbiota intestinal. Tradicionalmente, o método de cultivo microbiano tem sido utilizado e recentemente o estudo de ácidos nucleicos têm confirmado e aprofundado os resultados já conhecidos. O método de cultura microbiana parece ser relativamente mais barato, quando comparado aos demais métodos moleculares de identificação (i.e., genômica, transcriptômica), pois permite o crescimento de diversos microrganismos e pode ser feita de forma seletiva ou não, possibilitando a caracterização de microrganismos metabolicamente ativos e cultiváveis, além da possibilidade de estudo dos fatores de virulência microbianos (LAGIER *et al.*, 2015; AUSTIN, 2017; OVERMANN; ABT; SIKORSKI, 2017). São escassos os estudos que utilizam o método de cultura microbiana para caracterizar populações microbianas intestinais. Além disso, a quantidade de estudos diminui ainda mais ao relacionar este método com as variações nos microbiomas. Constata-se que, na maioria dos estudos encontrados atualmente, o método utilizado para caracterização dessas comunidades é a metagenômica. Esta técnica identifica geneticamente populações de microrganismos, mas não discrimina as viáveis (i.e., funcionais) de não viáveis (i.e., não funcionais).

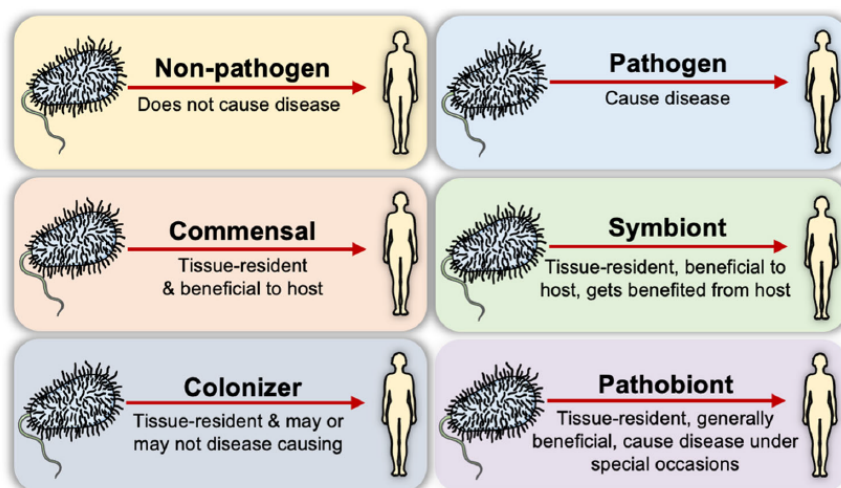
Portanto, o uso de diferentes metodologias para quantificar os microrganismos da microbiota intestinal e a avaliação deste microambiente em diferentes momentos no tempo é

crucial para entender como diferentes populações microbianas podem estar associadas a um determinado desfecho.

## 2. Revisão da literatura

### 2.1. Microbiota e simbiose

Microbiota é o nome dado a uma comunidade de microrganismos existentes (e.g., bactérias, fungos, arqueas e/ou vírus), independentemente do local em que reside (SAVAGE, 1977; MARCHESI; RAVEL, 2015; PRESCOTT, 2017). Em humanos, o termo é usado para descrever, geralmente, organismos que habitam determinada parte do corpo, ou seja, microbiota intestinal, bucal ou vaginal, por exemplo (TURNBAUGH *et al.*, 2007; KODUKULA *et al.*, 2017). Os microrganismos que compõem uma microbiota podem ser classificados de acordo com seu comportamento para com o hospedeiro. Portanto, micróbios “comensais” são os que residem no hospedeiro sem causar nenhuma doença e que o beneficiam (e.g., *Lactobacillus*). Os “colonizadores”, que podem ou não serem simbiotes e que comumente residem no corpo, ocasionalmente podem causar doenças (e.g., *Staphylococcus*). “Patobiontes” são simbiotes residentes em tecidos capazes de promover doenças apenas quando houver alterações em condições genéticas, ambientais e nutricionais específicas, favorecendo a quebra da barreira tecidual. Por fim, os “microrganismos transitórios/exógenos” têm, geralmente, origem ambiental e são capazes de causar doenças após a colonização do tecido hospedeiro (FUCHS *et al.*, 2012; CASADEVALL; PIROFSKI, 2014; JOCHUM; STECHER, 2020).



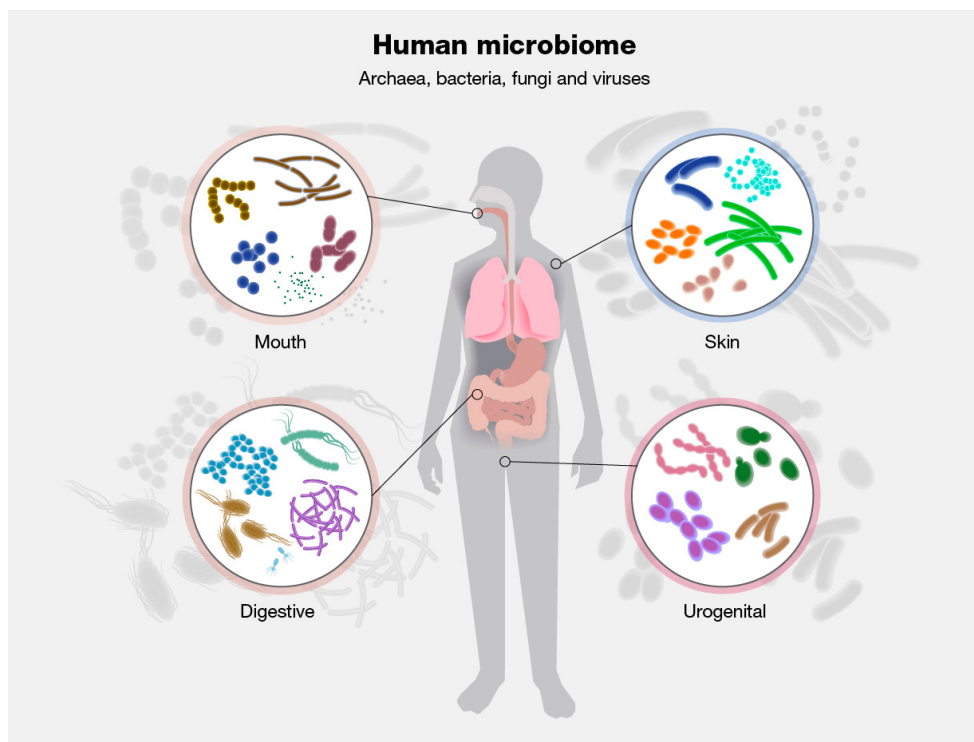
**Figura 1.** Tipos de microrganismos e sua relação com o hospedeiro. A maioria destas associações são específicas para cada condição e podem mudar com base em fatores como associação entre micróbios, disponibilidade nutricional, adequação da colonização e resposta imune. Portanto, sob condições alteradas, microrganismos comensais intestinais benéficos podem causar infecções oportunistas. Adaptado de Dey e Ray Chaudhuri, 2022

Disbiose é um termo usado para descrever um desequilíbrio na composição e na função da microbiota intestinal. Quando ocorre este desequilíbrio, há uma alteração na proporção de diferentes microrganismos no intestino, podendo levar a um aumento de patobiontes potencialmente prejudiciais ou uma diminuição de comensais, levando a um desequilíbrio na microbiota intestinal (MARCHESI *et al.*, 2016; SENDER; FUCHS; MILO, 2016). De forma geral, microrganismos comensais podem prevenir infecções patogênicas. Uma microbiota estável e em perfeito equilíbrio tende a impedir a colonização por exógenos. Em condição compatível com saúde, microrganismos patobiontes estão em menor abundância e são menos competitivos. Entretanto, sob determinadas condições, as interações entre os microrganismos e entre eles, mas também entre o hospedeiro, se alteram, tornando os patobiontes tornam-se mais competitivos (LI *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2018). A literatura vem nos mostrando que diversos patógenos podem causar infecções ou comensais podem tornar-se patobiontes oportunistas. Para tanto, se requer um conjunto específico de condições favoráveis que ditam a aptidão e sobrevivência dentro de um microambiente particular. Essas condições podem ser classificadas em três grandes categorias: adequação da colonização, mutação patoadaptativa e evasão da resposta imune do hospedeiro. Bactérias comensais podem não causar infecção em condições normais, mas a alteração em estados fisiológicos pode criar um microambiente tecidual que favorece o aumento da colonização dos patobiontes e infecções subsequentes (RIBET; COSSART, 2015; TROPINI, 2021). Na mesma direção, microrganismos transitórios e patógenos obrigatórios podem colonizar apenas quando a colonização ultrapassa a resposta imune do hospedeiro (PACZOSA; MECSAS, 2016; DE JONG; ALTO, 2018). Micróbios comensais que se considera permanecerem em associação simbiótica com o hospedeiro e cepas probióticas consideradas benéficas, sob certas condições, seu crescimento exacerbado está associado a várias doenças agudas e crônicas (LI *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2018). Além disso, não diretamente, mas os comensais podem ajudar os patógenos a melhorar sua eficiência de colonização e virulência (FAST *et al.*, 2018).

A classificação destes seres é feita através de nomenclaturas taxonômicas baseadas em características biológicas. Quando descoberto, o microrganismo é incorporado em determinado Domínio, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie, respectivamente (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990). Como esperado, a abundância de microrganismos hospedados também é vista, abrangendo diferentes Filos (i.e., *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteria*) e, conseqüentemente, espécies (THURSBY; JUGE, 2017). A grande maioria do microbioma humano reside na microbiota do TGI. O genoma desses



microrganismos codifica mais de 3 milhões de genes únicos, duas ordens de grandeza maiores que o número de genes no genoma humano. Mais de 1000 espécies foram detectadas no intestino, com representantes de pelo menos nove Filos bacterianos e cerca de 150 espécies dominantes no intestino de cada indivíduo (NEISH, 2009; HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012; MARTÍNEZ; MULLER; WALTER, 2013). O microbioma intestinal desempenha um papel crítico na determinação da saúde humana, influenciando o desenvolvimento e a função do sistema imunológico (MASLOWSKI *et al.*, 2009; CHUNG; KASPER, 2010; MASLOWSKI; MACKAY, 2011), processando nutrientes e afetando a absorção de energia pelo hospedeiro (HOOPER; MACPHERSON, 2010). Doenças inflamatórias intestinais (XAVIER; PODOLSKY, 2007) e enterocolite necrotizante (FELL, 2005; SCHNABL *et al.*, 2008) foram associadas a anormalidades na composição do microbioma intestinal e ativação inadequada das respostas do sistema imunológico direcionadas contra a microbiota intestinal (KOGUT; LEE; SANTIN, 2020; YOO *et al.*, 2020; ZHENG; LIWINSKI; ELINAV, 2020).



**Figura 2.** O microbioma humano. Diferentes microbiotas como a bucal, intestinal, genital e da pele compõem o microbioma humano. Adaptado de National Institutes of Health (NIH), 2022

Vários fatores podem causar mudanças na comunidade microbiana intestinal, incluindo a disponibilidade de nutrientes, consumo de drogas e a presença de patógenos oportunistas (MATSUMOTO et al., 2021; NOVA; GÓMEZ-MARTINEZ; GONZÁLEZ-SOLTERO, 2022; ZHANG, 2022). A biodiversidade, que se manifesta particularmente em nível de espécie e linhagem no microbioma intestinal, também parece atuar como um fator na manutenção e melhoraria o funcionamento deste microecossistema diante de mudanças ambientais (BÄCKHED et al., 2004; KRISS et al., 2018). Apenas certas cepas de *Bifidobacterium longum* mostraram fornecer proteção contra patógenos como *Escherichia coli* devido à presença de genes que codificam transportadores de carboidratos (FUKUDA et al., 2011). A virulência do *Staphylococcus epidermidis* varia entre diferentes cepas (GILL et al., 2005), assim como a capacidade do *Staphylococcus aureus* de inibir a formação do biofilme (IWASE et al., 2010).

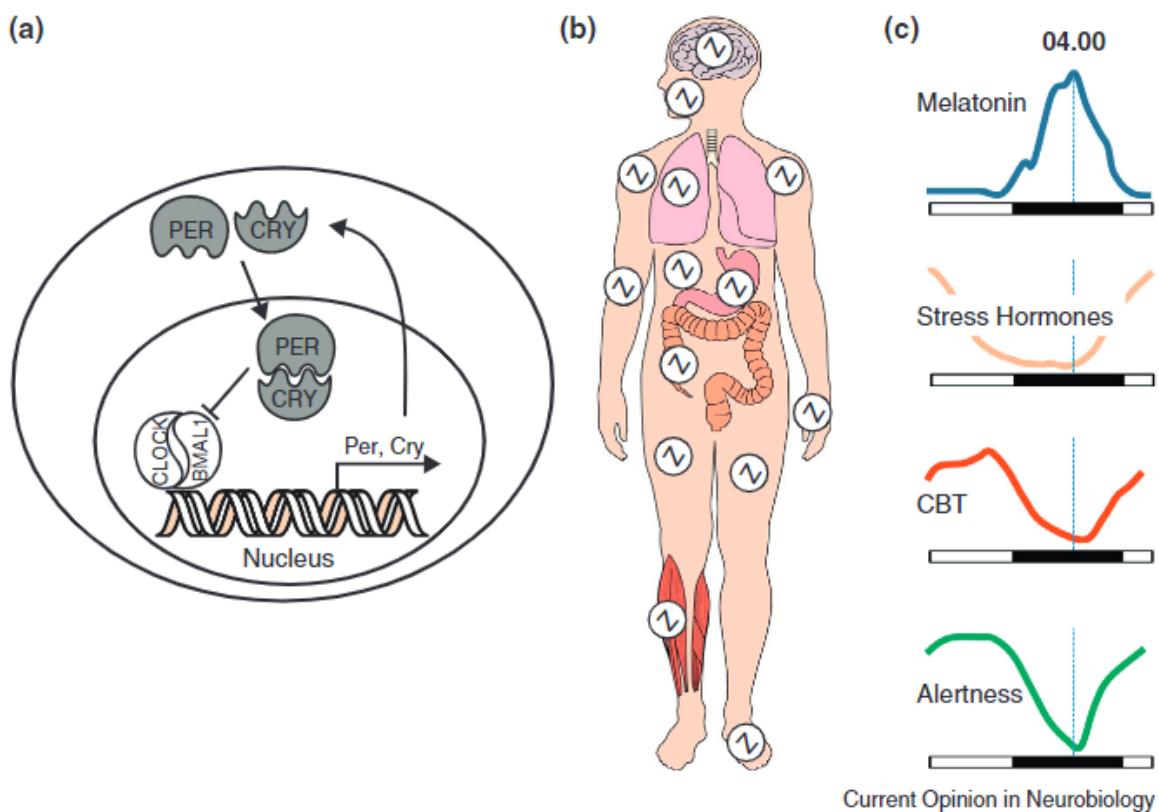
Aliado a isto, um dos fatores de grande influência na biodiversidade de microrganismos da microbiota intestinal é a biogeografia do TGI. A ecologia e organização espacial do TGI possibilita a organização de microrganismos nesse ambiente e que está sujeito a mudanças nesses padrões com o tempo (LAVELLE et al., 2016). A biogeografia busca estabelecer a estrutura da comunidade da microbiota em diferentes habitats corporais e nichos dentro desses habitats. Esta estrutura sofre mudanças por diversos fatores do hospedeiro, incluindo questões relacionadas a processos evolucionistas, diferenças populacionais etnogeográficas e distúrbios na estrutura geral do TGI (LEE et al., 2013; THAISS et al., 2016; LI et al., 2017). Além disso, diversos mecanismos potenciais foram propostos para explicar supostos gradientes transversais, incluindo gradientes na tensão radial de oxigênio, alterações no pH na interface luminal ou adaptação de produtores de butirato para metabolizar glicanos liberados de organismos degradadores de mucina sintrófica, enquanto mecanismos propostos para variação longitudinal incluem mudanças no pH, disponibilidade de substrato e expressão do hospedeiro de receptores de membrana (WANG et al., 2010; VAN DEN ABBEELE et al., 2013; ALBENBERG et al., 2014). Ainda, recentes publicações propõem que a luz, seja ela natural ou artificial, parece exercer um papel fundamental nestes mecanismos, podendo agir como um agente modulador no microbioma intestinal (SUMMA et al., 2013; THAISS et al., 2015; WU et al., 2018)

## 2.2. Ritmos biológicos e organização temporal

O ciclo claro-escuro, assim como diversos processos fisiológicos dos seres vivos (e.g., secreção de hormônios específicos, temperatura, pressão arterial) se comportam de forma cíclica (ASCHOFF, 1960, 1965). Os ritmos biológicos que apresentam duração de cerca de 24 horas são denominados “circadianos” (do latim, *circā* - “cerca de” + *diēs* - “um dia”; (HALBERG; PETERSON; SILBER, 1959; HALBERG, 1969)). Sua organização temporal interna, sincronizada com o meio ambiente, é crucial para a manutenção da saúde e é fornecida pelo Núcleo Supraquiasmático (NSQ), localizado no hipotálamo (MENAKER, 1972; CASSONE; LANE; MENAKER, 1983; RALPH *et al.*, 1990). Trata-se de um par de núcleos que recebem axônios provenientes de células ganglionares da retina que também funcionam como fotorreceptores, capazes de detectar mudanças de luminosidade do ambiente através de um pigmento fotossensível chamado melanopsina (CZEISLER *et al.*, 1981; BRAINARD *et al.*, 1982; FIGUEIRO *et al.*, 2005; BUIJS *et al.*, 2017). Após receber o sinal luminoso, o NSQ emite sinais para os demais órgãos e tecidos do corpo, agindo metaforicamente como o maestro de uma orquestra, na qual os instrumentos precisam estar sincronizados. Ou seja, ele é um relógio central que sincroniza os relógios periféricos às variações cíclicas do ambiente (STEPHAN; ZUCKER, 1972; DIBNER; SCHIBLER; ALBRECHT, 2010). Para os animais, esta sincronização ocorre, principalmente, pela luz, o principal sinalizador externo ou *zeitgeber*, termo em alemão que significa “doador de tempo” (ASCHOFF, 1960, 1965; SILVER *et al.*, 1996).

Um importante sinalizador gerado pelo NSQ, quando este recebe informação fótica, é a ativação ou supressão da síntese de melatonina, essencial para o funcionamento do relógio (REITER; FRASCHINI, 1969; REITER; SORRENTINO; JARROW, 1971). A síntese e secreção de melatonina produzida centralmente pela glândula pineal é estimulada pela ausência de luz que, via ação noradrenérgica, ativa a enzima arilalkilamina n-acetiltransferase (AANAT), convertendo serotonina em n-acetil-serotonina (NAS), a qual é convertida em melatonina pela enzima hydroxyindol-O-metiltransferase (HIOMT; KLEIN *et al.*, 1992; DO AMARAL; CIPOLLA-NETO; AFECHÉ, 2022). A melatonina é diretamente liberada na corrente sanguínea e no líquido cefalorraquidiano, enviando a informação temporal do período noturno para todo o organismo e servindo como comando biológico para regular o horário do ciclo sono-vigília (CIPOLLA-NETO; AMARAL, 2018; DO AMARAL; CIPOLLA-NETO; AFECHÉ, 2022). Visto que os níveis plasmáticos deste hormônio são baixos durante o dia, por conta da inibição de sua síntese (SUGDEN, 1989), e altos durante a

noite, a melatonina possui um papel fisiológico essencial na temporização circadiana do ciclo sono-vigília e de funções fisiológicas diárias. Este sistema neural complexo é produto da seleção natural que tornou o perfil noturno de secreção de melatonina como um representante interno da noite externa (AMARAL; CIPOLLA-NETO, 2018). Além do importante papel temporizador circadiano, é bem estabelecido o papel da melatonina como temporizador sazonal. A duração da secreção noturna de melatonina segue a duração da noite e, assim, varia ao longo do ano, fornecendo uma pista para a organização de funções rítmicas sazonais, como por exemplo a reprodução e o crescimento do pelo em alguns animais (LINCOLN; LOUDON, 2015).



**Figura 3.** Maquinário molecular dos ritmos biológicos. (a) O relógio molecular compreende um *loop* de feedback transcricional-translacional dos fatores de transcrição CLOCK e BMAL1 que, por sua vez, levam a expressão de *Per* e *Cry*, além de uma série de genes que regulam a fisiologia e o metabolismo. Após, PER e CRY inibem CLOCK e BMAL, autorregulando sua própria expressão. O período desse *loop* é de cerca de 24 horas (circadiano). (b) Em humanos, o relógio mestre está alojado no NSQ, onde este relógio se comunica e conduz os relógios periféricos do corpo, resultando em saídas fisiológicas rítmicas coordenadas. (c) Exemplos de tais saídas incluem (de cima para baixo) a regulação da secreção de melatonina pela pineal, níveis de hormônios do estresse (cortisol), regulação da temperatura corporal central (CBT) e níveis de alerta. Adaptado de Jagannath, Peirson e Foster, 2013.

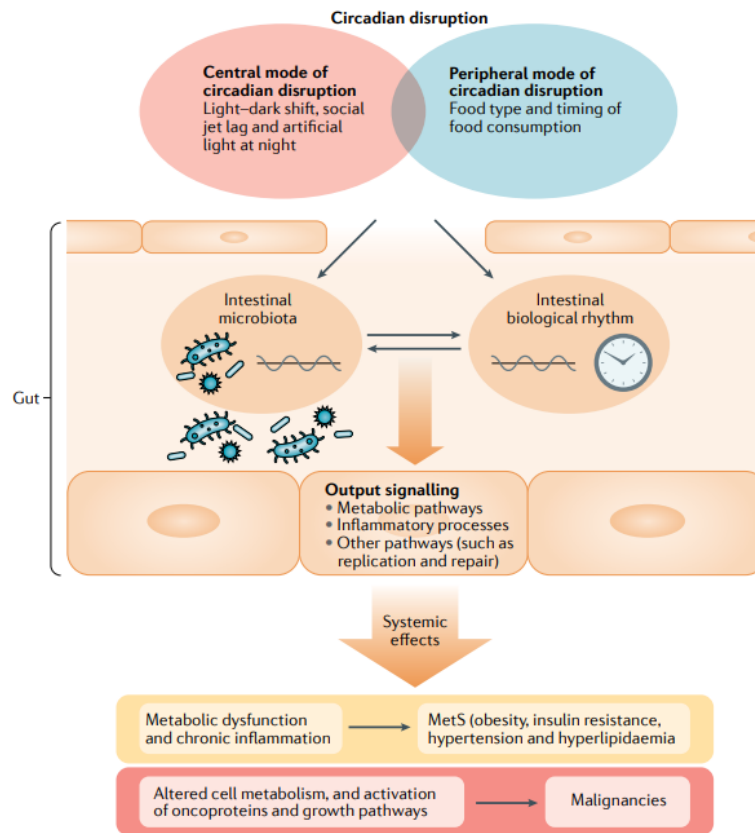
Em condições naturais, os ritmos endógenos são sincronizados com as variações de fatores externos (e.g., ciclo claro-escuro, horário de alimentação). Esta sincronização é essencial para manter a saúde e um bom funcionamento das funções fisiológicas do corpo (DUFFY; CZEISLER, 2009). No entanto, interferências externas ligadas a invenção da luz elétrica mudaram drasticamente a interação dos seres humanos com a luz. As rotinas sociais, agora moldadas por horários estritos e, geralmente, alocados em turnos matutinos, acabaram entrando em descompasso com o relógio endógeno, afetando a sincronização rítmica interna e podendo causar prejuízos à saúde (ALBRECHT; RIPPERGER, 2018). Diversos estudos mostram que a cronodisrupção, (i.e., desalinhamento entre ritmos internos e pistas externas) está associada com diferentes desfechos em saúde (ERREN; REITER, 2009; DE SOUZA; HIDALGO, 2015; BEAUVALET *et al.*, 2019). Estudos experimentais e epidemiológicos demonstram que a exposição irregular à iluminação e padrões alterados nos ritmos de atividade-reposo associam-se a piores desfechos metabólicos, sintomas depressivos e doenças intestinais (RÜGER; SCHEER, 2009; SMAGULA *et al.*, 2015; QIAN; SCHEER, 2016; ALTAHA *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2022). Ainda, a relação entre diferentes populações microbianas no trato gastrointestinal e a organização temporal do hospedeiro tem sido explorada em diversos estudos, mostrando que a perda de ritmicidade parece influenciar substancialmente nesse microambiente (THAISS *et al.*, 2014, 2016; DEEVER; EUM; TOBOREK, 2018; WU *et al.*, 2018). Portanto, destaca-se a importância de entender como a exposição à luz e a microbiota intestinal impactam na fisiologia e no metabolismo dos seres vivos.

### 2.3. Cronodisrupção, microbiota intestinal e eixo cérebro-intestino

Sob condições normais de iluminação, ou seja, períodos consistentes de claro e escuro, os ritmos de atividade-reposo, bem como expressão de genes do relógio e liberação de hormônios se mantêm sincronizados com o ciclo externo. No entanto, ao ocorrer a dessincronização entre ritmos endógenos e exógenos, o surgimento de diversas patologias parece estar associada ao processo que chamamos de cronodisrupção (ERREN; REITER, 2009; DE SOUZA; HIDALGO, 2015; BEAUVALET *et al.*, 2019). Em modelos animais, a exposição à luz constante induz um comportamento *free running* (livre-curso) dos ritmos de atividade-reposo, que se caracteriza por um ritmo não sincronizado a pistas ambientais e que oscila em um ciclo diferente de 24 horas. Consequentemente, os ritmos de alimentação são alterados, a amplitude da expressão de genes do relógio é reduzida e esta dessincronização também está associada a distúrbios metabólicos, como maiores níveis de tecido adiposo, alterações no gasto energético, resistência à insulina e metabolismo de glicose alterado (SUDO *et al.*, 2003; SHI *et al.*, 2013; CASIRAGHI *et al.*, 2016; CONSTANTINO *et al.*, 2022). Nesta mesma direção, em protocolos de dessincronização forçada, onde animais são submetidos a períodos diferentes de 24 horas, também são observados ganho de peso, maior gordura corporal e maiores níveis de triglicerídeos (CASIRAGHI *et al.*, 2016). Em humanos, diversos estudos demonstraram taxas mais altas de câncer (mama e próstata), doenças cardiovasculares, obesidade, doenças psiquiátricas e neurodegenerativas trabalhadores de turno (inversão de ciclo claro-escuro; (BECHTOLD; GIBBS; LOUDON, 2010; GOLOMBEK *et al.*, 2013; ZELINSKI; DEIBEL; MCDONALD, 2014; DE SOUZA; HIDALGO, 2015; BEAUVALET *et al.*, 2019). Recentemente, essa ruptura de ritmos tem sido associada a uma série de patologias intestinais, abrangendo, principalmente, questões relacionadas à microbiota intestinal.

Desde o início dos anos 1970, sabe-se que a função do trato gastrointestinal tem ritmos circadianos (FURUYA; YUGARI, 1974), mas dados recentes demonstram que o microbioma também exibe variações diurnas (THAISS *et al.*, 2014; ZARRINPAR *et al.*, 2014). Estudos *in vitro* demonstram que as bactérias exibem flutuações diurnas (e.g., *Enterobacter aerogenes*; PAULOSE *et al.*, 2016) e que o número de bactérias na camada mucosa epitelial varia durante os períodos claros e escuros (e.g., *Mucispirillum schaedleri*; THAISS *et al.*, 2016). Evidências sugerem que os ritmos microbianos estão fortemente inter-relacionados com o ritmo circadiano do hospedeiro. Os mecanismos específicos ainda

não são bem compreendidos, mas provavelmente são uma combinação de mecanismos dependentes e independentes do relógio circadiano.



**Figura 4.** A relação bidirecional entre a microbiota intestinal e seu hospedeiro. Os ritmos circadianos do hospedeiro influenciam a estrutura e função da microbiota intestinal, e os ritmos microbianos influenciam os ritmos circadianos no sistema digestivo; ambos os sistemas intactos são a chave para manter a homeostase metabólica do hospedeiro. Os fatores do estilo de vida moderno que levam à interrupção do ritmo circadiano (por exemplo, exposição à luz artificial à noite, ciclos irregulares de sono-vigília, comer tarde da noite) interrompem essa homeostase afetando a microbiota e o relógio circadiano do hospedeiro, mudando o metabolismo para aumentar a extração de calorias e diminuição do gasto energético, proporcionando um ambiente que promove a síndrome metabólica (MetS), inflamação crônica e uma série de malignidades. Adaptado de Bishehsari, Voigt e Keshavarzian, 2020.

Em modelos com roedores, cronodisrupções ambientais (mudanças semanais no ciclo claro-escuro) e perturbações genéticas em genes do relógio (nocaute do gene CLOCK, presente na regulação de ritmos circadianos) foram associadas com disbiose da microbiota intestinal, principalmente quando combinado com um estresse alimentar, como uma dieta rica em gordura ou consumo de álcool (VOIGT *et al.*, 2014; VOIGT, R. M. *et al.*, 2016). A disrupção da ritmicidade circadiana no hospedeiro também parece influenciar as populações bacterianas do intestino (VOIGT *et al.*, 2014; VOIGT, R. M. *et al.*, 2016; VOIGT, Robin M.

*et al.*, 2016). Thaiss e colaboradores demonstraram que até 20% das bactérias intestinais exibem flutuações diurnas em abundância relativa e atividade (THAISS *et al.*, 2014). Essas flutuações também foram observadas na abundância bacteriana em outros estudos (ZARRINPAR *et al.*, 2014; LIANG; BUSHMAN; FITZGERALD, 2015). Curiosamente, um estudo mostrou que os ritmos bacterianos em camundongos fêmeas são mais robustos do que os observados em camundongos machos (LIANG; BUSHMAN; FITZGERALD, 2015). Camundongos nocauteados para os genes PER1 e PER2 (genes do relógio) apresentaram perda de ritmicidade circadiana no TGI e, também, desenvolveram disbiose (THAISS *et al.*, 2014), resultado que se assemelha aos encontrados em ratos nocauteados para BMAL1, outro gene do relógio (LIANG; BUSHMAN; FITZGERALD, 2015). Logo, esses estudos parecem apoiar a ideia do papel desempenhado pelo genoma do hospedeiro na regulação do padrão circadiano da microbiota intestinal e que pode, em parte, ser impulsionado por diferenças induzidas pelo ritmo circadiano nos padrões luminosos, expressão de genes do relógios e alimentares.

Em estudos relacionados a saúde mental e a microbiota intestinal, não há consenso sobre uma composição da microbiota intestinal ideal para um melhor bem-estar (VALLES-COLOMER *et al.*, 2019), bem como também não há um consenso em relação a genes específicos que mantém uma população microbiana estável dentro do hospedeiro (DINAN; CRYAN, 2017; CHEUNG *et al.*, 2019). Estudos recentes também revelaram que o estresse pode resultar em disbiose intestinal e desequilíbrios na microbiota gastrointestinal, enquanto a disbiose, por sua vez, impacta fortemente na vulnerabilidade para o desenvolvimento de sintomas depressivos (RIOS *et al.*, 2017; DANTZER *et al.*, 2018; CATHOMAS *et al.*, 2019). Considerando a conexão entre a microbiota intestinal e humor, um tópico de pesquisa que vem ganhando destaque nos últimos anos é o eixo cérebro-intestino, que considera a importância da interconectividade e comunicação entre Sistema Nervoso Central (SNC) e o Sistema Nervoso Entérico (SNE), ligando centros emocionais e cognitivos do cérebro com funções periféricas intestinais (BERCIK, 2011; CAMILLERI *et al.*, 2012; CARABOTTI *et al.*, 2015).

Dentro desse eixo, a microbiota intestinal parece afetar a função cerebral por meio de três vias, produzindo um fluxo bidirecional de informações (BÄCKHED *et al.*, 2004; MACPHERSON; HARRIS, 2004; DIAZ HEIJTZ *et al.*, 2011; CRYAN; DINAN, 2012; BREIT *et al.*, 2018). A primeira delas é a via imunorreguladora, na qual a microbiota interage com as células imunes de forma a afetar os níveis de citocinas, fator de reação citocinética e prostaglandina (FENG; CHEN; WANG, 2018). A segunda é a via neuroendócrina. Existem



mais de 20 tipos de células enteroendócrinas no intestino, que constitui o maior órgão endócrino do corpo humano (RAYBOULD, 2010). Portanto, o microbioma intestinal poderia afetar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e o SNC, regulando a secreção de neurotransmissores como cortisol, triptofano e serotonina (5-HT). A terceira é a via do nervo vago, na qual o sistema nervoso entérico desempenha um papel importante (POWLEY *et al.*, 2008). Evidências anatômicas indicam que os neurônios sensoriais do plexo mioentérico intestinal estão expostos à microbiota intestinal. Logo, esses neurônios formam contatos sinápticos com neurônios motores no intestino que estão envolvidos na regulação da motilidade intestinal e na secreção de hormônios intestinais. O sistema nervoso intestinal também forma conexões sinápticas com o nervo vago, que conecta o intestino ao cérebro (POWLEY *et al.*, 2008) e constitui uma via de transmissão de informações que pode ser descrita como a via microbiota intestinal-SNE-vago-cérebro. Além disso, metabólitos neurotóxicos, como ácido D-lático e amônia produzidos pela microbiota intestinal, podem passar pelo nervo vago para o SNC, afetando assim a função cerebral, as respostas ao estresse e a estrutura do sono (BONAZ *et al.*, 2013; WANG; KASPER, 2014). Da mesma forma, o SNC também pode regular a composição da microbiota intestinal por meio dessas três vias. Por exemplo, o eixo HPA regula o peristaltismo intestinal e controla as funções das células epiteliais, afetando assim o ambiente da microbiota intestinal, incluindo a permeabilidade intestinal e alterando ainda mais a composição da microbiota intestinal (BERCIK, 2011; CAMILLERI *et al.*, 2012; BAUER; HUUS; FINLAY, 2016; ROGERS *et al.*, 2016).

### 3. JUSTIFICATIVA

A comunidade científica busca entender as relações de diferentes comunidades microbianas com as mais variadas questões fisiológicas do organismo, abrangendo, geralmente, desfechos relacionados a distúrbios psiquiátricos e metabólicos. Contudo, ao olharmos para a literatura, os poucos estudos que avaliam estas relações observam a microbiota de interesse em um único momento, deixando de lado a ritmicidade das populações microbianas. Portanto, a relação bidirecional entre ritmos biológicos e diferentes microbiotas, embora tenha avançado substancialmente, ainda está longe de ter sido totalmente explorada. Além disso, a microbiota intestinal tem sido associada com diversos desfechos em saúde, principalmente transtornos metabólicos (i.e., obesidade, resistência à insulina, hipertensão e hiperlipidemia) e mentais (i.e., depressão, ansiedade). Nesta mesma direção, transtornos metabólicos e mentais são constantemente associados em diversos estudos, sendo, geralmente, considerados fatores de risco para o desenvolvimento de outras doenças. Por isso, é fundamental que melhoremos nossa compreensão dos mecanismos por trás das mudanças de populações microbianas no intestino. Deste modo, visando entender a oscilação circadiana nas comunidades microbianas do TGI, um modelo experimental é ideal para estudar essa interação. O ambiente controlado e a alimentação *ad libitum* são essenciais para diminuir possíveis interferências que um modelo clínico está sujeito. Logo, conforme explicitado anteriormente, os métodos moleculares baseados em DNA existentes possuem limitações, fazendo necessário a aplicação de outro método complementar em estudos desta área.

#### 4. HIPÓTESES

A comunidade científica abrange grande parte de seus estudos no que diz respeito à relação entre a microbiota intestinal e desfechos relacionados à saúde. Além disso, a ritmicidade destas comunidades microbianas também já foi vista em alguns estudos, mesmo que escassos. Portanto, levantamos as seguintes hipóteses (H1):

- 1) Existe uma ritmicidade diurna das comunidades bacterianas da microbiota intestinal e será possível observá-la pelo método de cultura microbiana
- 2) Existe uma ritmicidade diurna das comunidades bacterianas com demandas de oxigênio distintas (i.e., aeróbios e anaeróbios) da microbiota intestinal e será possível observá-la pelo método de cultura microbiana
- 3) Existe uma ritmicidade diurna das comunidades fúngicas da microbiota intestinal e será possível observá-la pelo método de cultura microbiana
- 4) Existem diferenças biogeográficas entre as diferentes partes do trato gastrointestinal em relação a quantidade de microrganismos
- 5) Existem diferenças biogeográficas entre as diferentes partes do trato gastrointestinal em relação ao tipo de microrganismos de acordo com a sua demanda de oxigênio (i.e., aeróbios e anaeróbios)

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Geral

Compreender a oscilação circadiana do microbioma intestinal de ratos Wistar machos adultos por meio de análise de cultura microbiana de diferentes tecidos do trato gastrointestinal (i.e., ceco e reto) e fezes retiradas diretamente da ampola retal.

### 5.2 Específicos

- Descrever as bactérias aeróbias, anaeróbias facultativas, anaeróbias estritas e microaerofilicas pelo método de cultura microbiana, a cada 6 horas, por 24 horas em ratos Wistar macho;
- Descrever as populações aeróbias, anaeróbias facultativas, anaeróbias estritas e microaerofilicas pelo método de cultura microbiana, a cada 6 horas, por 24 horas no ceco, reto e fezes de ratos Wistar macho;
- Comparar as quantidades de microrganismos cultivados nos meios de cultura em relação ao momento do dia em que foi coletado (diferenças temporais)
- Comparar as quantidades de microrganismos cultivados nos meios de cultura em relação ao sítio de coleta (diferenças biogeográficas)

## 6. ARTIGO

### UNDERSTANDING THE DIURNAL OSCILLATION OF THE GUT MICROBIOTA USING MICROBIAL CULTURE

(Artigo publicado na revista *Life* em 19/03/2023)

**Authors:** Guilherme Amando<sup>1,2</sup>, André Tonon<sup>1,2</sup>, Débora Constantino<sup>3</sup>, Maria Paz Hidalgo<sup>1,2,4</sup>, Pabulo Henrique Rampelotto<sup>5\*</sup>, Francisco Montagner<sup>2,6</sup>

#### **Affiliations:**

<sup>1</sup> Chronobiology and Sleep Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre 90410-000, Brazil

<sup>2</sup> Graduate Program in Psychiatry and Behavioral Sciences, Faculty of Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre 90410-000, Brazil

<sup>3</sup> Faculty of Health and Medical Sciences, University of Surrey, Guildford GU2 7XH, United Kingdom

<sup>4</sup> Department of Psychiatry and Legal Medicine, Faculty of Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre 90410-000, Brazil

<sup>5</sup> Graduate Program in Biological Sciences: Pharmacology and Therapeutics, Institute of Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre 90410-000, Brazil

<sup>6</sup> Graduate Program in Dentistry, Faculty of Dental Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre 90410-000, Brazil

\* Correspondence: prampelotto@hcpa.edu.br

**Abstract:** The composition of the gut microbiota oscillates according to the light–dark cycle. However, the existing literature demonstrates these oscillations only by molecular methods. Microbial cultures are an interesting method for studying metabolically active microorganisms. In this work, we aimed to understand the diurnal oscillation of the intestinal microbiota in Wistar male rats through microbial culture analysis. Over a 24 h period, three animals were euthanized every 6 h. Intestinal segments were dissected immediately after euthanasia and diluted in phosphate-buffered saline (PBS) for plating in different culture media. The CFU/mL counts in feces samples cultured in the Brucella medium were significantly higher at ZT0, followed by ZT6, ZT18, and ZT12 ( $p = 0.0156$ ), which demonstrated the diurnal oscillation of metabolically active anaerobic bacteria every 6h using microbial culture. In addition, quantitative differences were demonstrated in anaerobic bacteria and fungi in different gastrointestinal tract tissues.

**Keywords:** microbiology; light-dark cycle; circadian rhythm; anaerobic bacteria; fungi.

## 1. Introduction

The circadian system provides rhythmicity to several physiological processes of living beings (e.g., hormonal secretion, temperature, and blood pressure) and is synchronized to cyclic environmental signals (i.e., external clues of temporality) in a process known as entrainment. Daily rhythms of approximately 24 h are called circadian rhythms [1–3]. The entrainment of the circadian system (endogenous) with environmental signals (exogenous) is crucial for maintaining health [4,5] and occurs mainly by light, the main zeitgeber (“time giver” in German; environmental cue of the passage of time) [6,7]. Moreover, circadian misalignment (mismatch between internal and external rhythms) is often observed to be associated with metabolic and gastrointestinal disorders [8–11].

Recent studies have demonstrated that the intestinal microbiota also undergoes diurnal compositional and functional oscillations, which are driven by the light–dark cycle [12–14]. This oscillation has been demonstrated in adults (and associated with short-chain fatty acid levels) [15] and in mice kept under different light exposure protocols, where the group in a forced jet lag protocol showed arrhythmicity of these populations [12]. Diurnal microbial pattern drives, in turn, the host physiology and metabolism in many ways [16]. Additionally, diabetes type 2 was associated with disrupted rhythmicity of microbial populations in the gut of a longitudinal population-based cohort [17]. Similarly, another study suggested that this microenvironment could be an independent contributor to elevated serum amino acid levels in participants with insulin resistance [18]. In addition to its diurnal oscillation, gut microbiota is influenced by biogeography, allowing the establishment of different microbial populations in each intestinal microenvironment [19,20].

Assessing microbial populations at different times is crucial for understanding such diurnal oscillations. Different studies have showed that pathological outcomes are associated with circadian rhythm disruption [21,22], which also induces microbiota dysbiosis [9,23]. Furthermore, a recent study demonstrated the oscillation of different microbial phyla in healthy mice, but also the lack of rhythmicity of mice in constant conditions (e.g., 24h of constant darkness every day) and knockout for clock genes [24]. Thus, it is important to address multiple time points to better characterize any gut microbiota change.

Different approaches can be used to characterize the gut microbiota. With the advent of high-throughput sequencing, most studies nowadays characterize these microbial

communities by metagenomics [25,26]. However, metagenomics does not discriminate viable from non-viable cells as well as active or quiescent microorganisms. This may be mitigated using RNA sequencing, but metatranscriptomics is still a high-cost technology inaccessible to most researchers. The microbial culture method can be used to study the metabolically active populations that represent major components of the intestinal microbiota, such as cultivable bacteria and fungi [27,28]. In addition, this traditional method can be the first step toward culturomics [27,29], where new microbial species can be taxonomically validated and officially named. Moreover, the microbial culture could complement the microbiota characterization provided by metagenomics because this molecular method may also detect inviable microorganisms, giving a false assumption about their role [30]. To date, a few studies have evaluated the diurnal oscillations in intestinal microbial populations, but none have used the microbial culture method.

To fulfill this need, the aim of this study was to analyze the microbial cultures of different tissues of the gastrointestinal tract (i.e., cecum and rectum) as well as feces taken directly from the rectal ampoule at different zeitgeber times to understand the diurnal oscillation of the gut microbiota of male Wistar rats.

## **2. Material and Methods**

### *2.1. Animals*

Male Wistar rats (n = 12) at 13 weeks of age were obtained from the Centro de Reprodução e Experimentação em Animais de Laboratório (CREAL, Porto Alegre, Brazil). The sample size calculation was based on work by Thaiss et al. (2016) and was defined based on the evaluation of circadian variation in the composition of the gut microbiota [13]. Before the protocol started, the rats had been moved daily among cages to ensure that all animals were housed with all other animals for at least 2 days. This procedure enables the induction of a uniform baseline microbiota across all of them. All animals were fed ad libitum with a regular chow diet and kept under the same controlled conditions of temperature ( $22 \pm 2$  C), humidity, reduced noise exposure, and a standard photoperiod (12 h light and 12 h dark, with lights on at 7:00 am). These conditions are the standard for a bioterium of rats that is not intended to cause any intervention or stress on the animals. The research protocol was approved by the Institutional Animal Research Ethics Committee at the Hospital de Clínicas

de Porto Alegre (CEUA/HCPA, protocol number 2019–0413), following the recommendations set out in the ARRIVE guidelines [31].

## *2.2. Experimental Protocol*

Over the course of a 24 h period, 3 animals were euthanized every 6 h. Immediately after euthanasia, the intestines were dissected on a sterile field. The small intestine was separated and sectioned to obtain samples of cecum and rectum. Feces were taken directly from the last portion of rectal ampoule. The fragments of each sample (i.e., cecum, rectum, and feces) were weighed and stored per animal in separate Falcon tubes, preparatory to microbial culturing. After collecting the sample, sterilized phosphate-buffered saline (PBS) solution was added to the tube, maintaining the proportion of 1 mg of sample to 1  $\mu$ L of PBS.

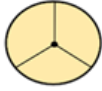



The procedures for the use of scientific animals were also conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [32]. This study was registered with the National System of Genetic Resource Management and Associated Traditional Knowledge (SisGen), under registration number ABFDC4F.

## *2.3. Serial Dilutions and Culture Media*

Serial dilutions were performed starting from the initial sample to 1/10, 1/1000, and 1/100,000 using PBS solution. The undiluted sample was pipetted at the center of a Petri dish. Each Petri dish (90  $\times$  15 mm) was divided into three equally distributed sections. Three 25  $\mu$ L drops of each dilution were pipetted into one of the three sections, one section per dilution, with no contact between drops [33]. The periods, conditions of incubation, and purpose of each culture medium used are described in Figure 1. The culture media (purchased from HiMedia®, Mumbai, India) chosen were selected to cover the main groups of cultivable microorganisms from the gut. This method was used only for the purpose of counting these microorganisms.



## Culture media incubation

		Period	Condition to grow	Purpose
<b>BHI</b> Brain Heart Infusion Agar		4 days	Microbiological incubator at 37°C	Facultative anaerobic or aerobic microbes
<b>SA</b> Sabouraud Agar		4 days	Incubated at room temperature (25°±2°C; first day), then at 37°C	Fungi and yeasts (obligate aerobes)
<b>MS</b> Mitis Salivarius Agar		4 days	Incubated in microaerophilia (carbon dioxide at 10%)	<i>Streptococcus spp.</i>
<b>BA</b> Brucella Agar		4 days	Incubated inside jars with anaerobic generators at 37°C	Strict or facultative anaerobic

**Figure 1.** Periods, conditions of incubation, and purpose of each culture medium. The three divided sections in the dish represented one section per dilution (i.e., 1/10, 1/1000, and 1/100,000).

The number of colony-forming units (CFU) present in a single drop (25 L per drop) was determined for each culture media by multiplying the number of CFU observed during counting by 40, 400, 40,000, or 4,000,000, depending on the dilution being counted, as obtained by the following equation: CFU initial sample/mL (total) = CFU count × 40 × dilution factor. These dilutions were chosen to allow better visualization of the cultivated colonies.

In cases where an extremely high number of colonies made counting of CFU impossible, it was decided to use the maximum number possible of CFU in a 25 L drop (i.e., 75 CFU) at dilution of  $10^{-5}$ , as described by Naghili et al. (2013) [33]. Petri plates with patterns indicative of contamination were excluded from analyses.

### 2.4. Time Measurements

The exact time referring to the light and dark phase is of major importance to our study because it is directly linked to the outcome. Thus, the results were described through the measure of time called zeitgeber time (ZT), commonly used to measure time in chronobiological studies. The ZTs correspond to six-hour intervals within a 24 h period, starting at the beginning of the light phase. The experimental protocol started at ZT0, which

corresponded to the moment when the lights in the biotarium were turned on, namely 7 am for the researchers.

### *2.5. Statistical Analysis*

All analyses were performed in GraphPad Prism version 8.4.2, with significance at  $p < 0.05$ . Study variables are described as median (interquartile ranges) because there was no parametric distribution of the data (see Table S1). For comparisons of CFU/mL counts between different sites and ZTs, the Kruskal–Wallis test followed by Dunn multiple comparison was used.

## **3. Results**

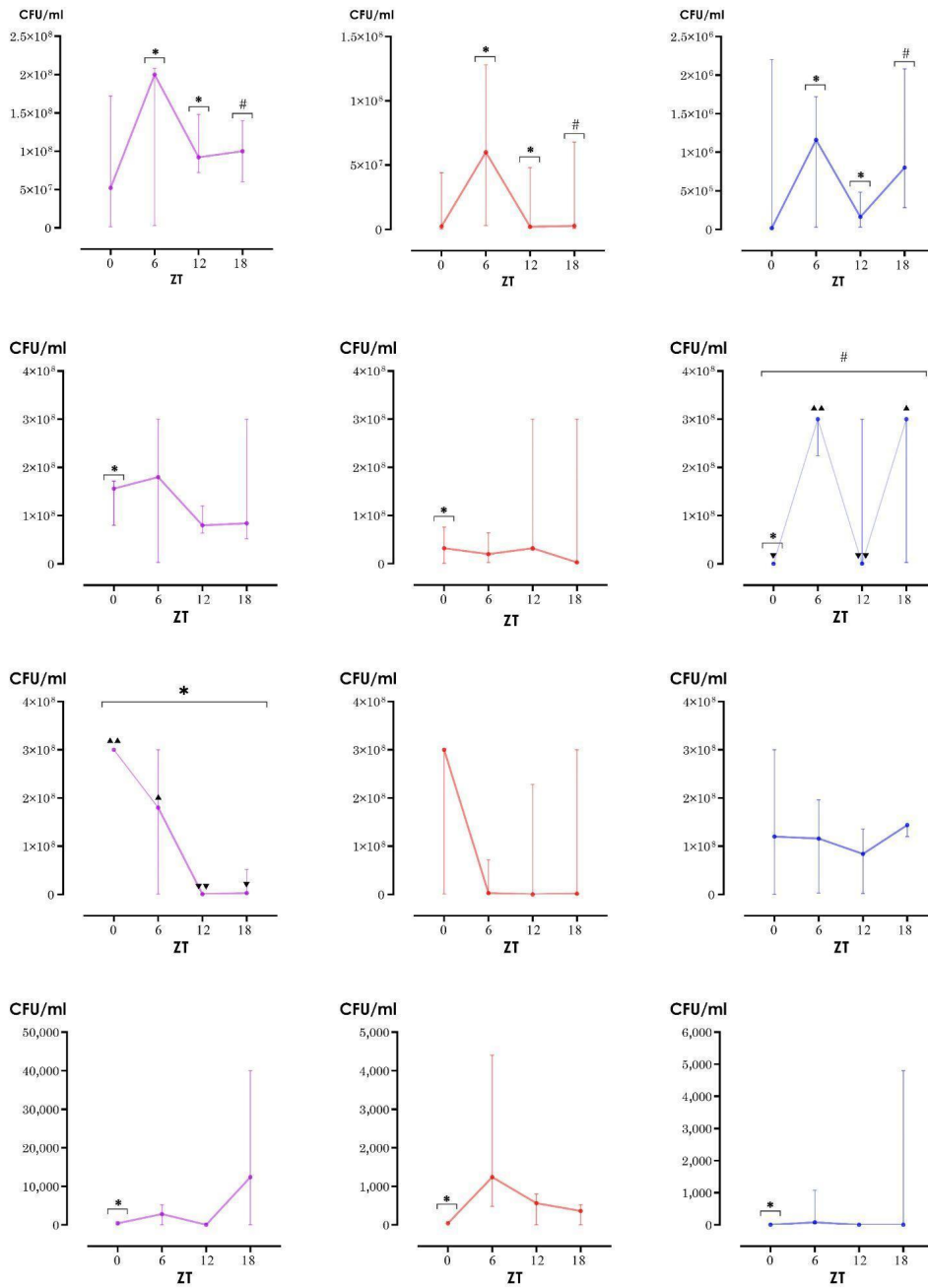
The CFU/mL results for each culture medium for samples collected at each ZT are expressed as their respective medians (see Figure 2 or Table S1).

### *3.1. Differences between ZTs*

In samples plated in BA medium, the CFU/mL count in feces was significantly higher ( $p = 0.0156$ ) at ZT0, followed by ZT6, ZT18, and ZT12. This indicates that the microorganisms cultivated in this medium peaked their concentration in the beginning of the light phase (ZT0), decreased in the middle of the light phase (ZT6), reached the lowest point at the end of light phase (ZT12), and started to increase their concentration again in the middle of the dark phase (ZT18). There was a trend towards statistical significance ( $p = 0.0662$ ) for the RT samples in the MS medium, with the highest CFU/mL count observed at ZT6, followed by ZT18, ZT12, and ZT0. Similarly, as observed in BA medium, this trend indicates that higher concentrations of microorganisms were observed during the light phase (ZT0 and ZT6 = light phase). Specifically, the concentration of CFU/mL peaked in the middle of the light phase (ZT6), reached the lowest point at the end of the light phase (ZT12), increased its concentration again in the middle of the dark phase (ZT18), and decreased again in the beginning of the light phase (ZT0). There was no statistical difference between ZTs in BHI and SA media.

### 3.2. Biogeographic Differences

In samples plated in BHI medium, the CFU/mL count was higher in FC than in CE and higher in CE than in RT at both ZT6 ( $p = 0.0321$ ) and at ZT12 ( $p = 0.0036$ ). This indicates that there is a different concentration of microorganisms and could indicate a distinct diversity in the middle of the light phase (ZT6) when comparing sample sites. There was a trend towards statistical significance at ZT18 ( $p = 0.075$ ) following the same pattern (i.e.,  $FC > CE > RT$ ) (Figure 2), indicating the same difference observed in BHI medium, but in the middle of the dark phase (ZT18). In samples plated in SA and MS media, there were statistically significant differences at ZT0 ( $p = 0.0214$ ;  $p = 0.0107$ ) following the same pattern, also indicating the same biogeographic differences observed in other media, but at the beginning of the light phase (ZT0). There was no statistical difference in samples plated in BA medium.



**Figure 2.** Panel of scattered dot plots illustrating median (IQR) of CFU/mL counts at each ZT. Each line corresponds to a culture medium, while each column corresponds to a collection site. Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s test for multiple comparisons were performed; Statistical significances ( $p < 0.05$ ) are marked with “\*”; Trends to significance ( $p > 0.05$  but  $< 0.07$ ) are marked with “#”; Differences in CFU/mL counts between ZTs are marked with black triangles. The direction and the number of black triangles indicate the hierarchical position of each point based on the CFU/mL count. ▲▲ = highest CFU/mL counting; ▲ = second highest CFU/mL counting; ▼▼ = lowest CFU/mL counting; ▼ = second lowest CFU/mL counting.

## 4. Discussion

In this preliminary work, we present evidence of the diurnal oscillation of microbial populations in the gut and differences in their composition using microbial culture methods. Our results also indicated differences among sampling sites, demonstrating biogeographical differences in different GI tract sites. Our main findings showed that the feces samples cultivated in Brucella agar (i.e., facultative anaerobic bacteria) exhibited microbial variation between ZTs, with higher concentrations of CFU/mL at the beginning and in the middle of the light period (i.e., resting phase). Using a metagenomic approach, Thaiss et al. (2014) found evidence of rhythmic disruption in microbial populations of Ruminococcaceae, a family belonging to Firmicutes (predominantly anaerobic) [12]. Two other species from this phylum also exhibited changes in relative abundance over the course of the day. These species had a higher relative abundance value in the resting phase [12]. Here, our results suggested a similar oscillation of bacterial concentration, although we used a microbial culture method, collecting species from different sites.

In this study, the laboratory growth conditions favored facultative anaerobic bacteria of the genus *Streptococcus* to be cultivated in the BA medium. There was a high number of microorganisms at the beginning of the light phase, observed by the peak in CFU/mL counting at ZT0. Li et al. (2017) observed that the gastrointestinal microbiome of rats is predominantly composed of the phylum Firmicutes, regardless of the tissue collected [20]. Similarly, Thaiss et al. (2016) demonstrated that *Mucispirillum schaedler*, a species from the Deferribacterota phylum that is also anaerobic, had higher concentrations at the beginning of the light phase [13]. Both studies seem to agree with the results of this study.

Our findings also revealed differences between collection sites in CFU counts during the middle of the light phase (ZT6), and afterward at the end of the light phase (ZT12) in BHI media (facultative anaerobic bacteria). These differences indicated that feces exhibited higher concentrations of microorganisms than the cecum and rectum, respectively. Relative abundance regarding the rhythmicity of bacterial communities in different sample sites of the intestinal tract of rats has also been reported throughout the day [12–14]. The control group exhibited a different configuration of bacterial genera depending on the time of day. However, rats submitted to a chronodisruption protocol lost the oscillatory pattern [12]. Another study observed similar rhythmicity of several microbial taxa once every 4 h [34]. We

observed different CFU counts depending on the time of day for bacteria cultivated in the BHI media, representing highly abundant and metabolically active microorganisms.

Results from the Mitis Salivarius and BHI culture media indicate biogeographical interference due to the highest CFU/mL values for FC, followed by CE and RT. Recently, the bacterial communities present in each segment of the gastrointestinal tract (feces and the contents of the large and small intestine) of male rats were described using metagenomics [35]. Higher bacterial diversity and proportion for bacterial components of different genera and families in the large intestine, but mainly in feces, were observed. These genera and families are mostly represented by anaerobic bacteria. Furthermore, Li et al. (2017) also presented results consistent with the study mentioned before. The diversity found was attributed to a more complex micro-ecosystem in the large intestine of rats, resulting in higher bacterial concentrations in feces [20]. Although cultures do not enable all microorganisms to be cultivated separately, our results from Mitis Salivarius and BHI are consistent with the studies mentioned above.

Fungi are an important component of the gut microbiome, but they are frequently neglected in most studies [36]. Here, we observed a higher CFU/mL count at the beginning of the light phase (i.e., rest period). Chen et al. (2018) demonstrated that *Aspergillus fumigatus* colonization in rats knocked out for different clock genes differed depending on the time at which the animal was infected. Moreover, there was a difference in CFU counts between the times, with the ZT0 having the highest number of CFU counts in the lung compared to ZT12. The authors suggested that the interaction between the host and this particular fungus may be under some circadian control [37]. In our study, higher fungal counts were also observed at the beginning of the morning (ZT0) in feces when compared to the other collection sites. However, *A. fumigatus* cannot be cultured in the SA medium. In our study, we incubated the SA media plates at room temperature (25 C ± 2 C) following incubation at 37 C (see Figure 1). As described by Hazen and Hazen (1987), *Candida albicans* room-temperature-grown cells were generally less sensitive to environmental perturbation and germinated more uniformly than cells grown at 37 C [38]. Furthermore, a different study suggested that there is a synergy between this fungus and species of *Bacteroides*. The authors observed that while *Bacteroides*' growth was significantly enhanced in co-culture with *C. albicans*, the cell concentrations of some strains of *C. albicans* were unaffected by the presence of specific *Bacteroides* species. This result suggests the cells of *C. albicans* may serve as an additional nutrient source for the

bacteria in anaerobic regions of the gut [39]. Here, this synergy could explain the higher concentrations of CFU/mL in feces when compared to other collection sites. *Bacteroides* species are mainly represented in BA media and, as described before, the concentration of CFU/mL in feces peaked at ZT0. This peak may have influenced the concentration of CFU/mL of fungi evaluated in the SA culture medium. Furthermore, this influence could have led to differentiation in the number of microorganisms between sites, resulting in a higher concentration of fungi in feces than in other sites.

To date, this is the first study to highlight the diurnal oscillation and biogeographical differences of the gut microbiota using culture media, and the results presented here have relevant implications. First, the identification of a diurnal oscillation of metabolically active anaerobic bacteria once every 6 h indicates that this component possibly impacts most studies involving the gut microbiota. Therefore, the evaluation of this oscillation is of major importance to ensure the reproducibility and reliability of future research. Furthermore, it is important to emphasize how different microorganisms can be in one day. For instance, in the same direction of melatonin's phase response, it is extremely important that every study focused on evaluating microbial communities should aim to assess at least three different moments during a day. Thus, future studies should consider a chronobiological design for the collection and evaluation of the outcome of interest, regardless of the microbiota. Moreover, our study provides a model of what to expect from regular variations of intestinal microorganisms because the rats were kept in normal conditions in every aspect (i.e., food intake, light exposure, no stressors). It is important to note that our preliminary results were obtained over the course of one 24 h period. Additional studies should be performed with longer periods of time to confirm the periodicity of our findings, but also to compare with different photoperiods. It is important to understand the extension of how metabolically active microorganisms behave in constant photoperiods (i.e., 24 h of constant light or darkness) to elucidate the role of light and its influence on the gut microbiota. It is also important to note that our small sample size was based on a sample size calculation, which supports the fact that our procedure and results derived from our methodology are not random. Similarly, there are plenty of studies evaluating outcomes related to the rhythmicity of the gut microbiota using small samples similar to ours [12,13]. In addition, these studies usually use some type of intervention, whether light (e.g., constant darkness) or medication (usually antibiotics). Thus, future studies should aim to increase the protocol time to assess whether the rhythmicity observed in some culture media is maintained over longer periods.

Second, the use of different culture media enables the detection of changes in intestinal microbial compositions at different collection sites, providing the baseline for the application of more advanced culture methods in future studies analyzing the circadian rhythm of the gut microbiota. Thus, this traditional method can be the first step toward the use of culturomics in circadian rhythm research, where new microbial species could be taxonomically validated and officially named. Moreover, it is important to note that one of our goals here was to observe the diurnal oscillation of anaerobic microorganisms more carefully because they also constitute a large portion of the gut microbiota. Furthermore, we also aimed to observe these oscillations in fungi, which are also an important component of the gut microbiome, though they are frequently neglected in most studies. Hence, we chose culture media that could fulfill these goals. More specifically, BA and MS culture media were chosen to cover most anaerobic bacteria, whereas BA and SA would cover aerobic microorganisms (bacteria and fungi, respectively; see Figure 1). Additionally, there is a portion of the gut microbiota that comprises non-culturable microorganisms and that plays an extremely important role in the physiology and homeostasis of this microenvironment. To meet this need, next generation sequencing techniques, such as amplicon sequencing (e.g., 16S rRNA), could be used to address non-culturable taxa characterization. Currently, this technique is the most widely applied in microbiome studies [25,26] and has plenty of standardized analytical pipelines aiming to produce accurate and reproducible results, thereby allowing comparison between studies [40]. It is important to note that we only used male rats due to uncertainty regarding whether there is any interaction with the estrous cycle and microbial communities in the gut. The literature has shown that the estrous cycle interferes with several physiological processes in rats [41–43]. We do not know for sure whether this process interferes with the rhythmicity of the gut microbiota, but to avoid the risk of influencing this microenvironment, we chose not to use female rats. Future studies should evaluate whether there is some interaction between the estrous cycle and microbial communities while controlling the phases of the estrous cycle that occur after the vaginal opening.

Third, we chose to use non-specific culture media in conditions to favor the growth of strict and facultative anaerobes, allowing the growth of a large group of cultivable microorganisms. Therefore, it is expected that they vastly cover the expected populations in the gut microbiota. It would also be interesting to evaluate the oscillation of specific targets, such as *Klebsiella* spp., which is fundamentally important in studies of hospital-acquired



infections and antibiotic resistance [44,45], as well as *Escherichia coli*, which has been observed to be associated with several intestinal diseases and virulence potential [46–48]. Furthermore, future studies should focus on evaluating lactic acid bacteria due to their relevance as one of the major components of microorganisms in the gut microbiota. Furthermore, plenty of culture media could be used to grow these microorganisms, such as MRS (De Man, Rogosa, and Sharpe) agar, for example. Other physiological and molecular aspects may be associated with these diurnal oscillations in the gut microbiota and should be observed in future studies. Wang et al. (2021) aimed to explore the effect of different feeding patterns on intestinal health through, among other parameters, the expression of short-chain fatty acids (SCFA), intestinal tight junction proteins, clock genes, and the diurnal rhythm of microbial populations in rabbits [49]. At the beginning of the dark phase (ZT13), levels of butyric acid (SCFA) were higher in the control group when compared to the restricted food group (intervention group). However, in the same ZT, levels of CLAUDIN-1 (intestinal tight junction proteins) and PER1 (clock gene) were significantly higher in the intervention group. In addition, there were different percentages of relative abundance in Firmicutes and Bacteroidetes phyla in ZT13; the first were cited higher in the intervention group but the second were cited lower in the same group [49]. Here, we observed different CFU/mL counting at ZT12 among the culture media, and the BA medium had the lowest count. This suggests a similar behavior observed of the Bacteroidetes phylum's relative abundance in the control group. Anaerobic bacteria are also present in this phylum. Therefore, the results of Wang et al. (2021) seem to agree with our results. Furthermore, aiming to fully understand the mechanisms that underlie the diurnal rhythmicity of the gut microbiota, future studies should aim to evaluate specific molecules that underlie the physiology of the gastrointestinal tract.

Lastly, it is important to emphasize that every methodology of assessing microbial populations has both advantages and limitations. The microbial culture-based method is time-consuming, dependent on culture media and incubation characteristics, and unsuitable for fastidious bacteria growth with complex nutritional requirements. Furthermore, as stated before, some microorganisms that cannot be cultivable and are crucial to understanding gut microbiota complexity. Remarkably, advances in molecular approaches contribute to several topics of microbiology research and have brought about a significant body of new knowledge regarding not only diseases, but also health aspects. However, as stated before, most molecular methods are not able to fully demonstrate the aspects of several microbiotas. The

characteristics of both culture-based and molecular methodologies were previously elucidated by Siqueira and Rôças (2005) [30]. The authors suggest a workflow on how to combine both methodologies to achieve a better understanding of the microenvironment landscape. Hence, we reinforce the idea that future studies should aim to incorporate both molecular and culture-based methods for a better understanding of the microbiota of interest.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/life13030831/s1>. Table S1: Median (minimum–maximum) CFU/mL values, considering culture media, sample type, and collection time.

**Author Contributions:** Methodology, G.A., A.T. and D.C.; Formal Analysis, G.A.; Writing—Original Draft Preparation, G.A. and P.H.R.; Writing—Review and Editing, M.P.H., P.H.R. and F.M.; Funding Acquisition, M.P.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work had the financial support of the Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA, funding number: 20190413). The authors are also grateful for the scholarships provided by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**Institutional Review Board Statement:** The research protocol was approved by the Institutional Animal Research Ethics Committee at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEUA/HCPA, protocol number 2019–0413). This study was registered with the National System of Genetic Resource Management and Associated Traditional Knowledge (SisGen), under registration number ABFDC4F.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors are grateful to the Unidade de Experimentação Animal (UEA) at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) for technical and logistical support.

**Conflicts of Interest:** We declare that there was no conflict of interest.

## References

1. Aschoff, J. Exogenous and Endogenous Components in Circadian Rhythms. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1960**, 25, 11–28. [CrossRef] [PubMed]
2. Foster, R.G.; Kreitzman, L. The Rhythms of Life: What Your Body Clock Means to You! *Exp. Physiol.* **2014**, 99, 599–606. [CrossRef] [PubMed]
3. Partch, C.L.; Green, C.B.; Takahashi, J.S. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol.* **2013**, 24, 90–99. [CrossRef]
4. Moore, R.Y.; Lenn, N.J. A retinohypothalamic projection in the rat. *J. Comp. Neurol.* **1972**, 146, 1–14. [CrossRef] [PubMed]
5. Welsh, D.K.; Takahashi, J.S.; Kay, S.A. Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties. *Annu. Rev. Physiol.* **2010**, 72, 551–577. [CrossRef] [PubMed]
6. Aschoff, J. Circadian Rhythms in Man. *Science* **1965**, 148, 1427–1432. [CrossRef]
7. Silver, R.; LeSauter, J.; Tresco, P.A.; Lehman, M.N. A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* **1996**, 382, 810–813. [CrossRef] [PubMed]
8. Rüger, M.; Scheer, F. Effects of circadian disruption on the cardiometabolic system. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2009**, 10, 245–260. [CrossRef]
9. Voigt, R.M.; Forsyth, C.B.; Green, S.; Mutlu, E.; Engen, P.; Vitaterna, M.H.; Turek, F.W.; Keshavarzian, A. Circadian Disorganization Alters Intestinal Microbiota. *PLoS ONE* **2014**, 9, e97500. [CrossRef]
10. Voigt, R.M.; Summa, K.C.; Forsyth, C.B.; Green, S.J.; Engen, P.; Naqib, A.; Vitaterna, M.H.; Turek, F.W.; Keshavarzian, A. The Circadian Clock Mutation Promotes Intestinal Dysbiosis. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2016**, 40, 335–347. [CrossRef]
11. Qian, J.; Scheer, F.A. Circadian System and Glucose Metabolism: Implications for Physiology and Disease. *Trends Endocrinol. Metab.* **2016**, 27, 282–293. [CrossRef]
12. Thaiss, C.A.; Zeevi, D.; Levy, M.; Zilberman-Schapira, G.; Suez, J.; Tengeler, A.C.; Abramson, L.; Katz, M.N.; Korem, T.; Zmora, N.; et al. Transkingdom Control of Microbiota Diurnal Oscillations Promotes Metabolic Homeostasis. *Cell* **2014**, 159, 514–529. [CrossRef] [PubMed]

13. Thaïss, C.A.; Levy, M.; Korem, T.; Dohnalová, L.; Shapiro, H.; Jaitin, D.A.; David, E.; Winter, D.R.; Gury-BenAri, M.; Tatirovsky, E.; et al. Microbiota Diurnal Rhythmicity Programs Host Transcriptome Oscillations. *Cell* **2016**, *167*, 1495–1510.e12. [CrossRef] [PubMed]
14. Wu, G.; Tang, W.; He, Y.; Hu, J.; Gong, S.; He, Z.; Wei, G.; Lv, L.; Jiang, Y.; Zhou, H.; et al. Light exposure influences the diurnal oscillation of gut microbiota in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *501*, 16–23. [CrossRef]
15. Kaczmarek, J.L.; Musaad, S.M.; Holscher, H.D. Time of day and eating behaviors are associated with the composition and function of the human gastrointestinal microbiota. *Am. J. Clin. Nutr.* **2017**, *106*, 1220–1231. [CrossRef]
16. Ferraz-Bannitz, R.; Beraldo, R.; Coelho, P.; Moreira, A.; Castro, M.; Foss-Freitas, M. Circadian Misalignment Induced by Chronic Night Shift Work Promotes Endoplasmic Reticulum Stress Activation Impacting Directly on Human Metabolism. *Biology* **2021**, *10*, 197. [CrossRef]
17. Reitmeier, S.; Kiessling, S.; Clavel, T.; List, M.; Almeida, E.L.; Ghosh, T.S.; Neuhaus, K.; Grallert, H.; Linseisen, J.; Skurk, T.; et al. Arrhythmic Gut Microbiome Signatures Predict Risk of Type 2 Diabetes. *Cell Host Microbe* **2020**, *28*, 258–272.e6. [CrossRef] [PubMed]
18. Pedersen, H.K.; Gudmundsdottir, V.; Nielsen, H.B.; Hyotylainen, T.; Nielsen, T.; Jensen, B.A.H.; Forslund, K.; Hildebrand, F.; Prifti, E.; Falony, G.; et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature* **2016**, *535*, 376–381. [CrossRef] [PubMed]
19. Donaldson, G.P.; Lee, S.M.; Mazmanian, S.K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14*, 20–32. [CrossRef] [PubMed]
20. Li, D.; Chen, H.; Mao, B.; Yang, Q.; Zhao, J.; Gu, Z.; Zhang, H.; Chen, Y.Q.; Chen, W. Microbial Biogeography and Core Microbiota of the Rat Digestive Tract. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 45840. [CrossRef]
21. Martel, J.; Chang, S.-H.; Ko, Y.-F.; Hwang, T.-L.; Young, J.D.; Ojcius, D.M. Gut barrier disruption and chronic disease. *Trends Endocrinol. Metab.* **2022**, *33*, 247–265. [CrossRef] [PubMed]
22. Cheng, W.-Y.; Ho, Y.-S.; Chang, R.C.-C. Linking circadian rhythms to microbiome-gut-brain axis in aging-associated neurodegenerative diseases. *Ageing Res. Rev.* **2022**, *78*, 101620. [CrossRef] [PubMed]
23. Swanson, G.R.; Burgess, H.J. Sleep and Circadian Hygiene and Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol. Clin. N. Am.* **2017**, *46*, 881–893. [CrossRef] [PubMed]

24. Heddes, M.; Altaha, B.; Niu, Y.; Reitmeier, S.; Kleigrewe, K.; Haller, D.; Kiessling, S. The intestinal clock drives the microbiome to maintain gastrointestinal homeostasis. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 6068. [CrossRef]
25. Bashiardes, S.; Zilberman-Schapira, G.; Elinav, E. Use of Metatranscriptomics in Microbiome Research. *Bioinform. Biol. Insights* **2016**, *10*, 19–25. [CrossRef]
26. Cao, Y.; Fanning, S.; Proos, S.; Jordan, K.; Srikumar, S. A Review on the Applications of Next Generation Sequencing Technologies as Applied to Food-Related Microbiome Studies. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1829. [CrossRef]
27. Lagier, J.-C.; Hugon, P.; Khelaifia, S.; Fournier, P.-E.; La Scola, B.; Raoult, D. The Rebirth of Culture in Microbiology through the Example of Culturomics to Study Human Gut Microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28*, 237–264. [CrossRef]
28. Austin, B. The value of cultures to modern microbiology. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **2017**, *110*, 1247–1256. [CrossRef]
29. Lagier, J.-C.; Dubourg, G.; Million, M.; Cadoret, F.; Bilen, M.; Fenollar, F.; Levasseur, A.; Rolain, J.-M.; Fournier, P.-E.; Raoult, D. Culturing the human microbiota and culturomics. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 540–550. [CrossRef] [PubMed]
30. Siqueira, J.F.; Rôças, I.N. Exploiting Molecular Methods to Explore Endodontic Infections: Part 1—Current Molecular Technologies for Microbiological Diagnosis. *J. Endod.* **2005**, *31*, 411–423. [CrossRef]
31. Kilkenny, C.; Browne, W.J.; Cuthill, I.C.; Emerson, M.; Altman, D.G. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *Veter-Clin. Pathol.* **2012**, *41*, 27–31. [CrossRef]
32. National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*; National Academies Press: Washington, DC, USA, **2011**.
33. Naghili, H.; Tajik, H.; Mardani, K.; Rouhani, S.M.R.; Ehsani, A.; Zare, P. Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. *Vet. Res. Forum* **2013**, *4*, 179–183. [PubMed]
34. Zarrinpar, A.; Chaix, A.; Yooseph, S.; Panda, S. Diet and Feeding Pattern Affect the Diurnal Dynamics of the Gut Microbiome. *Cell Metab.* **2014**, *20*, 1006–1017. [CrossRef] [PubMed]

35. Gu, S.; Chen, D.; Zhang, J.-N.; Lv, X.; Wang, K.; Duan, L.-P.; Nie, Y.; Wu, X.-L. Bacterial Community Mapping of the Mouse Gastrointestinal Tract. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e74957. [CrossRef] [PubMed]
36. Guzzo, G.L.; Andrews, J.M.; Weyrich, L.S. The Neglected Gut Microbiome: Fungi, Protozoa, and Bacteriophages in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2022**, *28*, 1112–1122. [CrossRef] [PubMed]
37. Chen, S.; Fuller, K.K.; Dunlap, J.C.; Loros, J.J. Circadian Clearance of a Fungal Pathogen from the Lung is not Based on Cell-intrinsic Macrophage Rhythms. *J. Biol. Rhythm.* **2017**, *33*, 99–105. [CrossRef]
38. Hazen, K.C.; Hazen, B.W. Temperature-Modulated Physiological Characteristics of *Candida albicans*. *Microbiol. Immunol.* **1987**, *31*, 497–508. [CrossRef]
39. Valentine, M.; Benadé, E.; Mouton, M.; Khan, W.; Botha, A. Binary interactions between the yeast *Candida albicans* and two gut-associated *Bacteroides* species. *Microb. Pathog.* **2019**, *135*, 103619. [CrossRef]
40. Rampelotto, P.H.; Sereia, A.F.; de Oliveira, L.F.V.; Margis, R. Exploring the Hospital Microbiome by High-Resolution 16S rRNA Profiling. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3099. [CrossRef]
41. Wierson, M.; Long, P.J.; Forehand, R.L. Toward a new understanding of early menarche: The role of environmental stress in pubertal timing. *Adolescence* **1993**, *28*, 913–924.
42. Smith, M.S. Estrus and Menstrual Cycles: Neuroendocrine Control. In *Encyclopedia of Neuroscience*; Squire, L.R., Ed.; Academic Press: Oxford, UK, **2009**.
43. Wagenmaker, E.R.; Moenter, S.M. Exposure to Acute Psychosocial Stress Disrupts the Luteinizing Hormone Surge Independent of Estrous Cycle Alterations in Female Mice. *Endocrinology* **2017**, *158*, 2593–2602. [CrossRef]
44. Batista, M.P.B.; Cavalcante, F.S.; Cassini, S.T.A.; Schuenck, R.P. Diversity of bacteria carrying antibiotic resistance genes in hospital raw sewage in Southeastern Brazil. *Water Sci. Technol.* **2022**, *87*, 239–250. [CrossRef] [PubMed]
45. Omar, N.M.S.; Erismis, B.; Osman, M.M.; Garba, B.; Hassan, M.A.; Akuku, I.G. Retrospective Evaluation of Nosocomial Bacterial Infections and Their Antimicrobial Resistance Patterns Among Hospitalized Patients in Mogadishu, Somalia. *Infect. Drug Resist.* **2023**, *16*, 705–720. [CrossRef]

46. Tyakht, A.V.; Manolov, A.I.; Kanygina, A.V.; Ischenko, D.S.; Kovarsky, B.A.; Popenko, A.S.; Pavlenko, A.V.; Elizarova, A.V.; Rakitina, D.V.; Baikova, J.P.; et al. Genetic diversity of *Escherichia coli* in gut microbiota of patients with Crohn's disease discovered using metagenomic and genomic analyses. *BMC Genom.* **2018**, *19*, 968. [CrossRef]
47. Santos-Neto, J.F.; Santos, A.; Nascimento, J.A.; Trovão, L.O.; Santos, F.F.; Valiatti, T.B.; Gales, A.C.; Marques, A.L.; Pinaffi, I.C.; Vieira, M.A.; et al. Virulence Profile, Antibiotic Resistance, and Phylogenetic Relationships among *Escherichia Coli* Strains Isolated from the Feces and Urine of Hospitalized Patients. *Pathogens* **2022**, *11*, 1528. [CrossRef] [PubMed]
48. Mansour, S.; Asrar, T.; Elhenawy, W. The multifaceted virulence of adherent-invasive *Escherichia coli*. *Gut Microbes* **2023**, *15*, 2172669. [CrossRef] [PubMed]
49. Wang, Q.-J.; Guo, Y.; Zhang, K.-H.; Zhang, L.; Geng, S.-X.; Shan, C.-H.; Liu, P.; Zhu, M.-Q.; Jin, Q.-Y.; Liu, Z.-Y.; et al. Night-Restricted Feeding Improves Gut Health by Synchronizing Microbe-Driven Serotonin Rhythm and Eating Activity-Driven Body Temperature Oscillations in Growing Rabbits. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 771088. [CrossRef]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## Supplementary Material

**Table S1.** Median (minimum-maximum) CFU/ml values, considering culture media, sample type, and collection time. Different capital letters in the same column represent statistically significant differences in alphabetic order among the collection sites for the same ZT ( $p < 0.05$ ; Kruskal-Wallis, Dunn). Different symbols in the same column represent statistically significant differences for different ZT specimens from the same site in the same culture media ( $p < 0.05$ ; Kruskal-Wallis, Dunn). BHI = Brain Heart Infusion Agar; SA = Sabouraud Agar; MS = Mitis Salivarius Agar; BA = Brucella Agar; FC = Feces; CE = Cecum; RT = Rectum; ZT = Zeitgeber time.

Feces Sample (FC)				
	BHI (CFU $\times 10^{+7}$ )	SA (CFU $\times 10^{+2}$ )	MS (CFU $\times 10^{+6}$ )	BA (CFU $\times 10^{+7}$ )
ZT0	5.20 (0.15 – 17.20)	4.00 (0.80 - 8.00) <b>A</b>	156.00 (80.00 - 172.00) <b>A</b>	30.00 (30.00 – 30.00) <b>‡</b>
ZT6	20.00 (0.30 – 20.80) <b>A</b>	28.00 (0 - 52.00)	180.00 (3.00 - 300.00)	18.00 (0.10 – 30.00) <b>#</b>
ZT12	9.20 (7.20 – 14.80) <b>A</b>	0 (0 - 4.00)	80.00 (64.00 - 12.00)	0.05 (0.001 – 0.18) <b>Ø</b>
ZT18	10.00 (6.00 – 14.00)	124.00 (0 - 400.00)	84.00 (52.00 - 300.00)	0.30 (0.21 – 5.20) <b>Θ</b>
Cecum Sample (CE)				
	BHI (CFU $\times 10^{+7}$ )	SA (CFU $\times 10^{+2}$ )	MS (CFU $\times 10^{+6}$ )	BA (CFU $\times 10^{+7}$ )
ZT0	0.23 (0.04 – 4.40)	0.40 (0.40 - 0.80) <b>B</b>	32.00 (0.76 - 76.00) <b>B</b>	30.00 (0.12 – 30.00)
ZT6	6.00 (0.30 – 12.80) <b>B</b>	12.40 (4.800 - 44.00)	20.00 (2.40 - 64.00)	0.30 (0.16 – 7.20)
ZT12	0.21 (0.11 – 4.80) <b>B</b>	5.60 (0 - 8.00)	32.00 (28.00 - 300.00)	0.003 (0.001 – 22.80)
ZT18	0.27 (0.08 – 6.80)	3.60 (0 - 5.20)	3.00 (2.04 - 300.00)	0.14 (0.00004 – 30.00)
Rectum Sample (RT)				
	BHI (CFU $\times 10^{+4}$ )	SA (CFU $\times 10^{+2}$ )	MS (CFU $\times 10^{+5}$ )	BA (CFU $\times 10^{+7}$ )
ZT0	1.80 (0.002 – 22.00)	0 (0 - 0.40) <b>C</b>	0.17 (0.0016 - 14.00) <b>C</b>	12.00 (0.03 – 30.00)
ZT6	116.00 (0.30 – 17.20) <b>C</b>	0.80 (0.40 - 10.80)	3000.00 (2240.00 - 3000.00)	11.60 (0.30 – 19.60)
ZT12	16.00 (0.30 – 4.80) <b>C</b>	0 (0 - 0)	4.40 (2.80 - 3000.00)	8.40 (0.23 – 13.60)
ZT18	80.00 (2.80 – 20.80)	0 (0 - 48.00)	3000.00 (30.00 - 3000.00)	14.40 (12.00 – 14.40)



## 7. Conclusões e Considerações Finais

Em concordância com as nossas hipóteses, destacamos as seguintes conclusões do estudo realizado para esta dissertação:

- Observamos uma variação nas contagens de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) pelo método de cultura microbiana a cada 6 horas. Portanto, este método deveria ser usado para o entendimento da microbiota intestinal e para complementar estudos baseados em análises de DNA, sobretudo genômica e metagenômica;
- Observamos uma oscilação diurna nas comunidades microbianas anaeróbias metabolicamente ativas e diferenças biogeográficas em relação a quantidade de microrganismos em cada sítio de coleta.

Portanto, as nossas perspectivas são:

- Usar diferentes fotoperíodos e tempos mais longos de protocolo para confirmar a periodicidade de nossos achados com diferentes intervenções;
- Realizar análises de comunidades microbianas por meio de sequenciamento de alto rendimento e que avaliam expressão proteica de constituintes desse microbioma, complementando e expandindo os resultados obtidos;
- Incorporar métodos moleculares e baseados em cultura para uma melhor compreensão da microbiota de interesse.

## 8. Referências bibliográficas

- ALBENBERG, L. *et al.* Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 147, n. 5, p. 1055-1063.e8, 2014.
- ALBRECHT, U.; RIPPERGER, J. A. Circadian Clocks and Sleep: Impact of Rhythmic Metabolism and Waste Clearance on the Brain. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 41, n. 10, p. 677–688, 2018.
- ALTAHA, B. *et al.* Genetic and environmental circadian disruption induce weight gain through changes in the gut microbiome. **Molecular Metabolism**, [s. l.], v. 66, p. 101628, 2022.
- AMARAL, F. G. do; CIPOLLA-NETO, J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 62, n. 4, p. 472–479, 2018.
- ASCHOFF, J. Circadian Rhythms in Man. **Science**, [s. l.], v. 148, n. 3676, p. 1427–1432, 1965.
- ASCHOFF, J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, [s. l.], v. 25, p. 11–28, 1960.
- AUSTIN, B. The value of cultures to modern microbiology. **Antonie Van Leeuwenhoek**, [s. l.], v. 110, n. 10, p. 1247–1256, 2017.
- BÄCKHED, F. *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 101, n. 44, p. 15718–15723, 2004.
- BAUER, K. C.; HUUS, K. E.; FINLAY, B. B. Microbes and the mind: emerging hallmarks of the gut microbiota-brain axis. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 632–644, 2016.
- BEAUXVALET, J. C. *et al.* Is chronodisruption a vulnerability factor to stress?. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 359, p. 333–341, 2019.
- BECHTOLD, D. A.; GIBBS, J. E.; LOUDON, A. S. I. Circadian dysfunction in disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 191–198, 2010.
- BERCIK, P. The microbiota-gut-brain axis: learning from intestinal bacteria?. **Gut**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 288–289, 2011.
- BISHEHSARI, F.; VOIGT, R. M.; KESHAVARZIAN, A. Circadian rhythms and the gut microbiota: from the metabolic syndrome to cancer. **Nature Reviews Endocrinology**, [s. l.], v. 16, n. 12, p. 731–739, 2020.
- BONAZ, B. *et al.* Vagus nerve stimulation: from epilepsy to the cholinergic anti-inflammatory pathway. **Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 208–221, 2013.
- BRAINARD, G. C. *et al.* The effect of different light intensities on pineal melatonin content. **Brain Research**, [s. l.], v. 233, n. 1, p. 75–81, 1982.
- BREIT, S. *et al.* Vagus Nerve as Modulator of the Brain-Gut Axis in Psychiatric and

- Inflammatory Disorders. **Frontiers in Psychiatry**, [s. l.], v. 9, p. 44, 2018.
- BUIJS, F. N. *et al.* Suprachiasmatic Nucleus Interaction with the Arcuate Nucleus; Essential for Organizing Physiological Rhythms. **eNeuro**, [s. l.], v. 4, n. 2, 2017.
- CAMILLERI, M. *et al.* Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. **Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 503–512, 2012.
- CARABOTTI, M. *et al.* The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. **Annals of Gastroenterology**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 203–209, 2015.
- CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Microbiology: Ditch the term pathogen. **Nature**, [s. l.], v. 516, n. 7530, p. 165–166, 2014.
- CASIRAGHI, L. P. *et al.* Effects of chronic forced circadian desynchronization on body weight and metabolism in male mice. **Physiological Reports**, [s. l.], v. 4, n. 8, p. e12743, 2016.
- CASSONE, V. M.; LANE, R. F.; MENAKER, M. Daily rhythms of serotonin metabolism in the medial hypothalamus of the chicken: effects of pinealectomy and exogenous melatonin. **Brain Research**, [s. l.], v. 289, n. 1–2, p. 129–134, 1983.
- CATHOMAS, F. *et al.* Neurobiology of Resilience: Interface Between Mind and Body. **Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 86, n. 6, Neurobiology of Resilience, p. 410–420, 2019.
- CHEUNG, S. G. *et al.* Systematic Review of Gut Microbiota and Major Depression. **Frontiers in Psychiatry**, [s. l.], v. 10, p. 34, 2019.
- CHUNG, H.; KASPER, D. L. Microbiota-stimulated immune mechanisms to maintain gut homeostasis. **Current Opinion in Immunology**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 455–460, 2010.
- CIPOLLA-NETO, J.; AMARAL, F. G. do. Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights. **Endocrine Reviews**, [s. l.], v. 39, n. 6, p. 990–1028, 2018.
- CONSTANTINO, D. B. *et al.* Relationship Between Circadian Strain, Light Exposure, and Body Mass Index in Rural and Urban Quilombola Communities. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 12, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2021.773969>. Acesso em: 17 out. 2022.
- CORNELISSEN, G. *et al.* Franz Halberg, MD (5 July 1919–9 June 2013) – In Appreciation. **Chronobiology International**, [s. l.], v. 30, n. 10, p. 1205–1207, 2013.
- COSTA, R. L. *et al.* Infectious complications following probiotic ingestion: a potentially underestimated problem? A systematic review of reports and case series. **BMC complementary and alternative medicine**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 329, 2018.
- CRESCI, G. A.; BAWDEN, E. Gut Microbiome: What We Do and Don't Know. **Nutrition in Clinical Practice: Official Publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 734–746, 2015.
- CRYAN, J. F.; DINAN, T. G. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. **Nature Reviews. Neuroscience**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 701–712,

2012.

CZEISLER, C. A. *et al.* Entrainment of human circadian rhythms by light-dark cycles: a reassessment. **Photochemistry and Photobiology**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 239–247, 1981.

DANTZER, R. *et al.* Resilience and immunity. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 74, p. 28–42, 2018.

DE JONG, M. F.; ALTO, N. M. Cooperative Immune Suppression by Escherichia coli and Shigella Effector Proteins. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 86, n. 4, p. e00560-17, 2018.

DE SOUZA, C. M.; HIDALGO, M. P. L. The midpoint of sleep on working days: a measure for chronodisruption and its association to individuals' well-being. **Chronobiology International**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 341–348, 2015.

DEAVER, J. A.; EUM, S. Y.; TOBOREK, M. Circadian Disruption Changes Gut Microbiome Taxa and Functional Gene Composition. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00737/full>. Acesso em: 8 dez. 2019.

DETHLEFSEN, L.; MCFALL-NGAI, M.; RELMAN, D. A. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. **Nature**, [s. l.], v. 449, n. 7164, p. 811–818, 2007.

DEY, P.; RAY CHAUDHURI, S. The opportunistic nature of gut commensal microbiota. **Critical Reviews in Microbiology**, [s. l.], p. 1–25, 2022.

DIAZ HEIJTZ, R. *et al.* Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 108, n. 7, p. 3047–3052, 2011.

DIBNER, C.; SCHIBLER, U.; ALBRECHT, U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. **Annual Review of Physiology**, [s. l.], v. 72, p. 517–549, 2010.

DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. **Gastroenterology Clinics of North America**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 77–89, 2017.

DO AMARAL, F. G.; CIPOLLA-NETO, J.; AFEICHE, S. C. Melatonin Synthesis Enzymes Activity: Radiometric Assays for AANAT, ASMT, and TPH. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, [s. l.], v. 2550, p. 33–43, 2022.

DONALDSON, G. P.; LEE, S. M.; MAZMANIAN, S. K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 20–32, 2016.

DUFFY, J. F.; CZEISLER, C. A. Effect of Light on Human Circadian Physiology. **Sleep Medicine Clinics**, [s. l.], v. 4, n. 2, Basics of Circadian Biology and Circadian Rhythm Sleep Disorders, p. 165–177, 2009.

ERREN, T. C.; REITER, R. J. Defining chronodisruption. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 245–247, 2009.

FAST, D. *et al.* Commensal pathogen competition impacts host viability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 115, n. 27, p.

7099–7104, 2018.

FELL, J. M. E. Neonatal inflammatory intestinal diseases: necrotising enterocolitis and allergic colitis. **Early Human Development**, [s. l.], v. 81, n. 1, p. 117–122, 2005.

FENG, Q.; CHEN, W.-D.; WANG, Y.-D. Gut Microbiota: An Integral Moderator in Health and Disease. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, p. 151, 2018.

FIGUEIRO, M. G. *et al.* Preliminary evidence for a change in spectral sensitivity of the circadian system at night. **Journal of Circadian Rhythms**, [s. l.], v. 3, p. 14, 2005.

FOSTER, J. A.; MCVEY NEUFELD, K.-A. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 36, n. 5, p. 305–312, 2013.

FUCHS, T. M. *et al.* Metabolic adaptation of human pathogenic and related nonpathogenic bacteria to extra- and intracellular habitats. **FEMS microbiology reviews**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 435–462, 2012.

FUKUDA, S. *et al.* Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. **Nature**, [s. l.], v. 469, n. 7331, p. 543–547, 2011.

FURUYA, S.; YUGARI, Y. Daily rhythmic change of L-histidine and glucose absorptions in rat small intestine in vivo. **Biochimica Et Biophysica Acta**, [s. l.], v. 343, n. 3, p. 558–564, 1974.

GILL, S. R. *et al.* Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 187, n. 7, p. 2426–2438, 2005.

GOLOMBEK, D. A. *et al.* The times they're a-changing: Effects of circadian desynchronization on physiology and disease. **Journal of Physiology-Paris**, [s. l.], v. 107, n. 4, Special issue on Time perception, p. 310–322, 2013.

HALBERG, F. Chronobiology. **Annual Review of Physiology**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 675–726, 1969.

HALBERG, F.; PETERSON, R. E.; SILBER, R. H. Phase relations of 24-hour periodicities in blood corticosterone, mitoses in cortical adrenal parenchyma, and total body activity. **Endocrinology**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 222–230, 1959.

HE, G. *et al.* Noninvasive measurement of anatomic structure and intraluminal oxygenation in the gastrointestinal tract of living mice with spatial and spectral EPR imaging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 96, n. 8, p. 4586–4591, 1999.

HOOPER, L. V.; MACPHERSON, A. J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. **Nature Reviews. Immunology**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 159–169, 2010.

HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, [s. l.], v. 486, n. 7402, p. 207–214, 2012.

IWASE, T. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm

- formation and nasal colonization. **Nature**, [s. l.], v. 465, n. 7296, p. 346–349, 2010.
- JAGANNATH, A.; PEIRSON, S. N.; FOSTER, R. G. Sleep and circadian rhythm disruption in neuropsychiatric illness. **Current Opinion in Neurobiology**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 888–894, 2013.
- JOCHUM, L.; STECHER, B. Label or Concept – What Is a Pathobiont?. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 28, n. 10, p. 789–792, 2020.
- KHALYFA, A. *et al.* Exosomes and Metabolic Function in Mice Exposed to Alternating Dark-Light Cycles Mimicking Night Shift Work Schedules. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 8, 2017. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2017.00882/full>. Acesso em: 8 dez. 2019.
- KLEIN, D. C. *et al.* Regulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. **Biochemical Society Transactions**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 299–304, 1992.
- KODUKULA, K. *et al.* Gut Microbiota and Salivary Diagnostics: The Mouth Is Salivating to Tell Us Something. **BioResearch Open Access**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 123–132, 2017.
- KOGUT, M. H.; LEE, A.; SANTIN, E. Microbiome and pathogen interaction with the immune system. **Poultry Science**, [s. l.], v. 99, n. 4, p. 1906–1913, 2020.
- KOROPATKIN, N. M.; CAMERON, E. A.; MARTENS, E. C. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. **Nature Reviews. Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 323–335, 2012.
- KRISS, M. *et al.* Low diversity gut microbiota dysbiosis: drivers, functional implications and recovery. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 44, p. 34–40, 2018.
- LAGIER, J.-C. *et al.* Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 208–236, 2015.
- LAVELLE, A. *et al.* Colonic biogeography in health and ulcerative colitis. **Gut Microbes**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 435–442, 2016.
- LEE, S. M. *et al.* Bacterial colonization factors control specificity and stability of the gut microbiota. **Nature**, [s. l.], v. 501, n. 7467, p. 426–429, 2013.
- LEONE, V. *et al.* Effects of diurnal variation of gut microbes and high-fat feeding on host circadian clock function and metabolism. **Cell Host & Microbe**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 681–689, 2015.
- LI, D. *et al.* Microbial Biogeography and Core Microbiota of the Rat Digestive Tract. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, p. 45840, 2017.
- LI, J. *et al.* Rest-Activity Rhythm Is Associated With Obesity Phenotypes: A Cross-Sectional Analysis. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 13, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2022.907360>. Acesso em: 6 fev. 2023.
- LI, X.-Q. *et al.* Risks associated with high-dose *Lactobacillus rhamnosus* in an *Escherichia coli* model of piglet diarrhoea: intestinal microbiota and immune imbalances. **PLoS One**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. e40666, 2012.

- LIANG, X.; BUSHMAN, F. D.; FITZGERALD, G. A. Rhythmicity of the intestinal microbiota is regulated by gender and the host circadian clock. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 112, n. 33, p. 10479–10484, 2015.
- LINCOLN, G.; LOUDON, A. Looking inside the seasonal clock. **Journal of Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 76–77, 2015.
- MACPHERSON, A. J.; HARRIS, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nature Reviews. Immunology**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. 478–485, 2004.
- MARCHESI, J. R. *et al.* The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. **Gut**, [s. l.], v. 65, n. 2, p. 330–339, 2016.
- MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, [s. l.], v. 3, p. 31, 2015.
- MARTÍNEZ, I.; MULLER, C. E.; WALTER, J. Long-term temporal analysis of the human fecal microbiota revealed a stable core of dominant bacterial species. **PLoS One**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. e69621, 2013.
- MASLOWSKI, K. M. *et al.* Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. **Nature**, [s. l.], v. 461, n. 7268, p. 1282–1286, 2009.
- MASLOWSKI, K. M.; MACKAY, C. R. Diet, gut microbiota and immune responses. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 5–9, 2011.
- MATSUMOTO, N. *et al.* Relationship between Nutrient Intake and Human Gut Microbiota in Monozygotic Twins. **Medicina**, [s. l.], v. 57, n. 3, p. 275, 2021.
- MENAKER, M. Nonvisual light reception. **Scientific American**, [s. l.], v. 226, n. 3, p. 22–29, 1972.
- METCALF, A. M. *et al.* Simplified assessment of segmental colonic transit. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 92, n. 1, p. 40–47, 1987.
- NEISH, A. S. Microbes in gastrointestinal health and disease. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 136, n. 1, p. 65–80, 2009.
- NIH. **Talking Glossary of Genomic and Genetic Terms**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Microbiome>. .
- NOVA, E.; GÓMEZ-MARTINEZ, S.; GONZÁLEZ-SOLTERO, R. The Influence of Dietary Factors on the Gut Microbiota. **Microorganisms**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 1368, 2022.
- OVERMANN, J.; ABT, B.; SIKORSKI, J. Present and Future of Culturing Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 71, p. 711–730, 2017.
- PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 629–661, 2016.
- PARKAR, S. G.; KALSBECK, A.; CHEESEMAN, J. F. Potential Role for the Gut Microbiota in Modulating Host Circadian Rhythms and Metabolic Health. **Microorganisms**,

[*s. l.*], v. 7, n. 2, 2019.

PAULOSE, J. K. *et al.* Human Gut Bacteria Are Sensitive to Melatonin and Express Endogenous Circadian Rhythmicity. **PLoS One**, [*s. l.*], v. 11, n. 1, p. e0146643, 2016.

POWLEY, T. L. *et al.* Ultrastructural evidence for communication between intramuscular vagal mechanoreceptors and interstitial cells of Cajal in the rat fundus. **Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, [*s. l.*], v. 20, n. 1, p. 69–79, 2008.

PRESCOTT, S. L. History of medicine: Origin of the term microbiome and why it matters. **Human Microbiome Journal**, [*s. l.*], v. 4, p. 24–25, 2017.

QIAN, J.; SCHEER, F. A. J. L. Circadian System and Glucose Metabolism: Implications for Physiology and Disease. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, [*s. l.*], v. 27, n. 5, p. 282–293, 2016.

RALPH, M. R. *et al.* Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. **Science (New York, N.Y.)**, [*s. l.*], v. 247, n. 4945, p. 975–978, 1990.

RAYBOULD, H. E. Gut chemosensing: interactions between gut endocrine cells and visceral afferents. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, [*s. l.*], v. 153, n. 1–2, p. 41–46, 2010.

REITER, R. J.; FRASCHINI, F. Endocrine aspects of the mammalian pineal gland: a review. **Neuroendocrinology**, [*s. l.*], v. 5, n. 3, p. 219–255, 1969.

REITER, R. J.; SORRENTINO, S.; JARROW, E. L. Central and peripheral neural pathways necessary for pineal function in the adult female rat. **Neuroendocrinology**, [*s. l.*], v. 8, n. 6, p. 321–333, 1971.

RIBET, D.; COSSART, P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. **Microbes and Infection**, [*s. l.*], v. 17, n. 3, p. 173–183, 2015.

RIOS, A. C. *et al.* Microbiota abnormalities and the therapeutic potential of probiotics in the treatment of mood disorders: **Reviews in the Neurosciences**, [*s. l.*], v. 28, n. 7, p. 739–749, 2017.

ROGERS, G. B. *et al.* From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: mechanisms and pathways. **Molecular Psychiatry**, [*s. l.*], v. 21, n. 6, p. 738–748, 2016.

RÜGER, M.; SCHEER, F. A. J. L. Effects of circadian disruption on the cardiometabolic system. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, [*s. l.*], v. 10, n. 4, p. 245–260, 2009.

SAVAGE, D. C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annual Review of Microbiology**, [*s. l.*], v. 31, p. 107–133, 1977.

SCHNABL, K. L. *et al.* Necrotizing enterocolitis: A multifactorial disease with no cure. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, [*s. l.*], v. 14, n. 14, p. 2142–2161, 2008.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. **PLoS biology**, [*s. l.*], v. 14, n. 8, p. e1002533, 2016.

SHI, S. *et al.* Circadian disruption leads to insulin resistance and obesity. **Current biology**:



CB, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 372–381, 2013.

SILVER, R. *et al.* A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. **Nature**, [s. l.], v. 382, n. 6594, p. 810–813, 1996.

SMAGULA, S. F. *et al.* Circadian rest-activity rhythms predict future increases in depressive symptoms among community-dwelling older men. **The American Journal of Geriatric Psychiatry: Official Journal of the American Association for Geriatric Psychiatry**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 495–505, 2015.

STEPHAN, F. K.; ZUCKER, I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 1583–1586, 1972.

SUDO, M. *et al.* Constant light housing attenuates circadian rhythms of mPer2 mRNA AND mPER2 protein expression in the suprachiasmatic nucleus of mice. **Neuroscience**, [s. l.], v. 121, n. 2, p. 493–499, 2003.

SUGDEN, D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. **Experientia**, [s. l.], v. 45, n. 10, p. 922–932, 1989.

SUMMA, K. C. *et al.* Disruption of the Circadian Clock in Mice Increases Intestinal Permeability and Promotes Alcohol-Induced Hepatic Pathology and Inflammation. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. e67102, 2013.

THAISS, C. A. *et al.* A day in the life of the meta-organism: diurnal rhythms of the intestinal microbiome and its host. **Gut Microbes**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 137–142, 2015.

THAISS, C. A. *et al.* Microbiota Diurnal Rhythmicity Programs Host Transcriptome Oscillations. **Cell**, [s. l.], v. 167, n. 6, p. 1495-1510.e12, 2016.

THAISS, C. A. *et al.* Transkingdom Control of Microbiota Diurnal Oscillations Promotes Metabolic Homeostasis. **Cell**, [s. l.], v. 159, n. 3, p. 514–529, 2014.

THURSBY, E.; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. **The Biochemical Journal**, [s. l.], v. 474, n. 11, p. 1823–1836, 2017.

TROPINI, C. How the Physical Environment Shapes the Microbiota. **mSystems**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. e0067521, 2021.

TURNBAUGH, P. J. *et al.* The Human Microbiome Project. **Nature**, [s. l.], v. 449, n. 7164, p. 804–810, 2007.

VALLES-COLOMER, M. *et al.* The neuroactive potential of the human gut microbiota in quality of life and depression. **Nature Microbiology**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 623–632, 2019.

VAN DEN ABBEELE, P. *et al.* Butyrate-producing Clostridium cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model. **The ISME Journal**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 949–961, 2013.

VOIGT, R. M. *et al.* Chapter Nine - Circadian Rhythm and the Gut Microbiome. *Em*: CRYAN, J. F.; CLARKE, G. (org.). **International Review of Neurobiology**. [S. l.]: Academic Press, 2016. (Gut Microbiome and Behavior). v. 131, p. 193–205. *E-book*.

Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0074774216301167>. Acesso em: 8 dez. 2019.

VOIGT, R. M. *et al.* Circadian disorganization alters intestinal microbiota. **PloS One**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. e97500, 2014.

VOIGT, Robin M. *et al.* The Circadian Clock Mutation Promotes Intestinal Dysbiosis. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 335–347, 2016.

WANG, Y. *et al.* Regional mucosa-associated microbiota determine physiological expression of TLR2 and TLR4 in murine colon. **PloS One**, [s. l.], v. 5, n. 10, p. e13607, 2010.

WANG, Y.; KASPER, L. H. The role of microbiome in central nervous system disorders. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 38, p. 1–12, 2014.

WELSH, D. K.; TAKAHASHI, J. S.; KAY, S. A. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. **Annual Review of Physiology**, [s. l.], v. 72, p. 551–577, 2010.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 87, n. 12, p. 4576–4579, 1990.

WU, G. *et al.* Light exposure influences the diurnal oscillation of gut microbiota in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 501, n. 1, p. 16–23, 2018.

XAVIER, R. J.; PODOLSKY, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, [s. l.], v. 448, n. 7152, p. 427–434, 2007.

YANG, C. *et al.* Possible role of the gut microbiota-brain axis in the antidepressant effects of (R)-ketamine in a social defeat stress model. **Translational Psychiatry**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. 1294, 2017.

YIN, J. *et al.* Melatonin reprogramming of gut microbiota improves lipid dysmetabolism in high-fat diet-fed mice. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 65, n. 4, p. e12524, 2018.

YOO, J. Y. *et al.* Gut Microbiota and Immune System Interactions. **Microorganisms**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 1587, 2020.

ZARRINPAR, A. *et al.* Diet and Feeding Pattern Affect the Diurnal Dynamics of the Gut Microbiome. **Cell metabolism**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 1006–1017, 2014.

ZELINSKI, E. L.; DEIBEL, S. H.; MCDONALD, R. J. The trouble with circadian clock dysfunction: Multiple deleterious effects on the brain and body. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 40, p. 80–101, 2014.

ZHANG, P. Influence of Foods and Nutrition on the Gut Microbiome and Implications for Intestinal Health. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 17, p. 9588, 2022.

ZHENG, D.; LIWINSKI, T.; ELINAV, E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. **Cell Research**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 492–506, 2020.

## Anexo A - Carta de aprovação do projeto pelo CEUA/HCPA



### HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

#### Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

#### Carta de Aprovação

Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

**Projeto:** 2019/0413

**Título:** AS MODIFICAÇÕES DA MICROBIOTA INTESTINAL DE RATOS WISTAR EM UM MODELO DE RESTRIÇÃO DE SONO: INTERSECÇÕES DO SISTEMA CIRCADIANO, RESPOSTA FISIOLÓGICA AO ESTRESSE E SISTEMA IMUNE

**Pesquisador Responsável:** MARIA PAZ LOAYZA HIDALGO

#### Equipe de Pesquisa:

ANDRE COMIRAN TONON

DEBORA BARROGGI  
CONSTANTINO

MELISSA ALVES BRAGA DE  
OLIVEIRA

DIOGO ONOFRE DE SOUZA

FRANCISCO MONTAGNER

GUILHERME RODRIGUEZ



**Data de Aprovação:** 18/07/2019

**Data de Término:** 01/05/2021

Espécie/Linhagem	Sexo/Idade	Quantidade	Data Reunião	Documento
RATO HETEROGÊNICO	M/3 Mês(es)	28		
RATO HETEROGÊNICO	M/3 Mês(es)	5		
RATO HETEROGÊNICO	M/3 Mês(es)	72		

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

## Anexo B - Comprovante de publicação do artigo pela revista *Life*

[Life] Manuscript ID: life-2188654; doi: 10.3390/life13030831. Paper has been published. Externa Caixa de entrada x  



life@mdpi.com

para mim, atonon, debora.bconstantino, mhidalgo, prampelotto, francisco.montagner, billing, website, life, mona.zou, diana.lu

06:04 (há 5 horas)



Dear Authors,

We are pleased to inform you that your article "Understanding the Diurnal Oscillation of the Gut Microbiota Using Microbial Culture" has been published in *Life* as part of the Special Issue Feature Papers in Microbiology and is available online:

Website: <https://www.mdpi.com/2075-1729/13/3/831>

PDF Version: <https://www.mdpi.com/2075-1729/13/3/831/pdf>

The meta data of your article, the manuscript files and a publication certificate are available here (only available to corresponding authors after login):

[https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review\\_info/4abdd7b6e53d7092306f0f870ec650ce](https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review_info/4abdd7b6e53d7092306f0f870ec650ce)

Special Issue:

[https://www.mdpi.com/journal/life/special\\_issues/feature\\_microbiology](https://www.mdpi.com/journal/life/special_issues/feature_microbiology)



Journals

Topics

Information

Author Services

Initiatives

About

Sign In / Sign Up

Submit

Search for Articles:

Title / Keyword

Author / Affiliation / Email

Life

All Article Types

Search

Advanced

Journals / Life / Volume 13 / Issue 3 / 10.3390/life13030831



Submit to this Journal

Review for this Journal

Edit a Special Issue

### Article Menu

Academic Editor



Einar Ringe

Subscribe SciFeed

Related Info Link

<

Order Article Reprints



Open Access Communication

### Understanding the Diurnal Oscillation of the Gut Microbiota Using Microbial Culture

by  Guilherme Amado <sup>1,2</sup>,  André Tonon <sup>1,2</sup>,  Débora Constantino <sup>3</sup>,  Maria Paz Hidalgo <sup>1,2,4</sup>,  Pabulo Henrique Rampelotto <sup>5,\*</sup> and  Francisco Montagner <sup>2,6</sup>

- <sup>1</sup> Chronobiology and Sleep Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre 90410-000, Brazil
- <sup>2</sup> Graduate Program in Psychiatry and Behavioral Sciences, Faculty of Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre 90410-000, Brazil
- <sup>3</sup> Faculty of Health and Medical Sciences, University of Surrey, Guildford GU2 7XH, UK
- <sup>4</sup> Department of Psychiatry and Legal Medicine, Faculty of Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre 90410-000, Brazil
- <sup>5</sup> Graduate Program in Pharmacology and Therapeutics, Institute of Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre 90410-000, Brazil
- <sup>6</sup> Graduate Program in Dentistry, Faculty of Dental Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre 90410-000, Brazil

