



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

CARLA GRAZIELLE BUENO SILVA

DIETA RICA EM INULINA-FOS ALTERA MICROBIOTA
INTESTINAL, ATIVIDADE CEREBRAL E RESPOSTA
CARDIOVASCULAR EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS (SHR)

CAMPINAS
2018

CARLA GRAZIELLE BUENO SILVA

DIETA RICA EM INULINA-FOS ALTERA MICROBIOTA INTESTINAL, ATIVIDADE
CEREBRAL E RESPOSTA CARDIOVASCULAR EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS (SHR)

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

ORIENTADOR: MARIO JOSÉ ABDALLA SAAD

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA CARLA
GRAZIELLE BUENO SILVA, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. MARIO JOSÉ ABDALLA SAAD

CAMPINAS
2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2016/047235; FAPESP, 2016/108077; CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Si38d Silva, Carla Grazielle Bueno, 1987-
Dieta rica em inulina-FOS altera microbiota intestinal, atividade cerebral e resposta cardiovascular em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) / Carla Grazielle Bueno Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Mario Jose Abdalla Saad.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hipertensão. 2. Sistema nervoso. 3. Fibras na dieta. I. Saad, Mario Jose Abdalla, 1956-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Inulin-FOS rich diet alters gut microbiota, brain activity and cardiovascular response in spontaneously hypertensive rats (SHR)

Palavras-chave em inglês:

Hypertension

Nervous system

Dietary fiber

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Mario Jose Abdalla Saad [Orientador]

Maria Carolina Santos Mendes

Andrey dos Santos

Carla Roberta de Oliveira Carvalho

Bruno de Melo Carvalho

Data de defesa: 15-06-2018

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO
CARLA GRAZIELLE BUENO SILVA

Orientador(a) PROF(a). DR(a). MARIO JOSÉ ABDALLA SAAD

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. MARIO JOSÉ ABDALLA SAAD**
- 2. PROFA. DRA. MARIA CAROLINA SANTOS MENDES**
- 3. PROF. DR. ANDREY DOS SANTOS**
- 4. PROFA. DRA. CARLA ROBERTA DE OLIVEIRA CARVALHO**
- 5. PROF. DR. BRUNO DE MELO CARVALHO**

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 15 de junho de 2018

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais Nelsir e Carlos que me proporcionaram uma ótima educação mesmo nas épocas mais difíceis que passamos, além do apoio incondicional em todo tempo. Muito obrigada.

Aos meus irmãos e minha vó Elza por torcerem por mim sempre.

Ao meu orientador, professor Mario Saad. Graças a ele muitas portas se abriram na minha vida profissional. E eu não só agradeço ao orientador, mas ao excelente médico que ele é.

Aos meus colegas de trabalho no Licri por terem me ensinado tanto. A lista é longa e eu sou muito grata a esse grande laboratório. Vou sentir muitas saudades das horas de bancada, dos almoços descontraídos (no bandeirão e em vários restaurantes em Barão Geraldo). Só não vou sentir saudades mesmo dos experimentos fora do horário de expediente (ou talvez eu sinta falta até desses...).

Agradeço à Sandrinha, Andrey, Dioze e ao seu Josimo por estarem sempre dispostos a nos ajudar / socorrer no laboratório.

Aos funcionários do biotério: seu Zé, seu Antonio, Marino e o Marcos por serem tão solícitos com a gente e cuidarem tão bem dos animais.

Aos colegas do laboratório do professor José Gontijo. Sou muito grata pela atenção de vocês e pelas inúmeras vezes que me receberam.

A professora Fernanda Klein, por me ensinar a aferir pressão arterial em ratos.

Aos colegas do laboratório do professor Lício Velloso, pela colaboração e por todas as vezes que me ajudaram no Núcleo

Aos colegas do laboratório da professora Jasenka Zubcevic, na Universidade da Flórida, pela oportunidade de vivenciar a pesquisa em outro país.

Agradeço à Capes e à Fapesp pela oportunidade e pela confiança no meu trabalho.

Agradeço ao Bember, meu bem, meu companheiro pra vida que acompanhou cada passo dessa vida de pos graduacao. Não foi fácil, mas graças a ele (e nossas gatinhas) eu tenho um porto seguro =)

Obrigada!

Resumo

É bem estabelecido que a hipertensão está associada à disfunção autonômica e à disbiose intestinal. Aqui, mostramos que a dieta rica em inulina / FOS por um longo período altera a microbiota intestinal, promove a disfunção autonômica e aumenta a pressão arterial (PA) em ratos espontaneamente hipertensos (*Spontaneously Hypertensive Rat* - SHR). Essas alterações foram acompanhadas pela ativação de regiões cerebrais cardio reguladoras, como o núcleo paraventricular (*Paraventricular nucleus* - PVN) do hipotálamo e núcleo do trato solitário (NTS), medido pela imagem de ressonância magnética aprimorada com manganês (*manganese-enhanced magnetic resonance imaging* - MEMRI). A PA também foi significativamente aumentada no rato Wistar-Kyoto (WKY) alimentado com dieta inulina / fructo-oligossacarídeos (FOS) submetido ao estresse de restrição, embora em menor grau.

Métodos: ratos WKY e SHR de 4 semanas de idade foram alimentados com a dieta rica em inulina / FOS (fibra, n = 6) ou sua dieta de controle equivalente em calorias (ctl, n = 6) (Research Diets, Inc .) por 14 semanas. A PA foi medida semanalmente pelo método caudal não invasivo e por telemetria, além do teste de estresse por restrição pelo período de 20 minutos. A análise espectral da pressão sistólica foi realizada para derivar variáveis autonômicas.

Resultados: a dieta rica em inulina / FOS causou alterações significativas nos perfis bacterianos intestinais em WKY e SHR aumentando, por exemplo, a população de *Bifidobacterium* em WKY. Não observamos alterações na PA nos ratos WKY sem

restrição de movimento; no entanto, os SHR alimentados com dieta inulina / FOS apresentaram uma PA significativamente maior em comparação com o controle ($163,8 \pm 1,6$ mmHg versus $169,6 \text{ mmHg} \pm 1,3$; $p = 0,0083$, $n = 6$). O estresse da restrição de movimento produziu um aumento pequeno na PA nos WKY alimentados com inulina / FOS em comparação com o controle ($104,5 \pm 7,45$ mmHg versus $116,3 \pm 3,19$ mmHg; $p = 0,0411$, $n = 6$). Este efeito foi mais pronunciado nos SHR alimentados com inulina / FOS em comparação com os SHR que receberam dieta controle ($189,6 \pm 2,1$ mmHg versus $198,9 \pm 1,9$ mmHg; $p = 0,0024$, $n = 6$).

Essas respostas podem ser associadas a uma tendência no aumento da taxa LF / HF (*low frequency / high frequency*) (vasovagal) no grupo WKY alimentado com dieta rica em fibra ($1,99 \pm 1,43$ versus $3,04 \pm 1,46$; $p = 0,09$, $n = 6$) e um aumento significativo no LF / HF no SHR alimentado com dieta rica em fibras ($6,49 \pm 0,47$ versus $8,16 \pm 0,59$, $p = 0,0306$, $n = 6$). O MEMRI mostrou aumento na atividade no PVN (-0.6514 ± 0.07 versus 0.05026 ± 0.06 , $p = 0.0018$, $n = 3$) e NTS ($0.1194 \pm 0.05 \pm 0.3817 \pm 0.09$; $p = 0.0409$, $n = 3$) em SHR alimentado com dieta inulina / FOS.

Conclusão: A microbiota intestinal desempenha um papel importante na comunicação cérebro-intestino na hipertensão. Isto pode representar um novo alvo terapêutico para o tratamento da hipertensão.

Palavras-chave: Hipertensão arterial, Sistema nervoso, fibras alimentares

Abstract

It is well established that hypertension is associated with autonomic dysfunction and gut dysbiosis. Here, we show that chronic inulin/FOS-rich diet alters gut microbiota, promotes autonomic dysfunction, and increases blood pressure (BP) in conscious unrestrained spontaneously hypertensive rat (SHR), as well as the SHR submitted to restraint stress. These alterations were accompanied by activation of cardiorespiratory brain regions, namely the paraventricular nucleus (PVN) of hypothalamus and solitary tract nucleus (NTS), as measured by manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). BP was also significantly increased in the inulin/FOS diet-fed Wistar-Kyoto (WKY) rat submitted to restraint stress, albeit to a lesser extent.

Methods: Male 4 weeks old WKY and SHR were fed with either the inulin/fructooligosaccharides (FOS)-rich diet (fiber, n=6), or its calorie-matched control diet (ctl, n=6) (Research Diets, Inc.) for 14 weeks. BP was measured weekly by tail cuff and telemetry, and during 20 minutes of restraint stress. Spectral analysis of BP waveform signal was performed to derive autonomic variables. MEMRI was performed in SHR at tenth week on diet.

Results: Inulin/FOS-rich diet caused significant shifts in gut bacterial profiles in WKY and SHR (e.g. Bifidobacterium population increased in diet-fed WKY: 0.006624 ± 0.0018 vs. 0.4989 ± 0.1745 , n=6; p=0.0073, n=6, and diet-fed SHR: 0.03099 ± 0.0127 vs. 0.2134 ± 0.0656 ; p=0.0258, n=6). We observed no change in BP in conscious unrestrained WKY; however, conscious unrestrained SHR fed with inulin/FOS diet had

significantly higher BP compared to control (163.8 ± 1.6 vs. 169.6 ± 1.3 ; $p=0.0083$, $n=6$). Restraint stress produced a small but significant increase in BP in inulin/FOS-fed WKY compared to control (104.5 ± 7.45 mmHg vs. 116.3 ± 3.19 mmHg; $p=0.0411$, $n=6$). This effect was more pronounced in the SHR on inulin/FOS compared to control diet (189.6 ± 2.1 vs. 198.9 ± 1.9 ; $p=0.0024$, $n=6$). These responses were associated with a trend in increase in LF/HF (vasovagal) balance in the diet-fed WKY (1.99 ± 1.43 vs. 3.04 ± 1.46 ; $p=0.09$, $n=6$), and a significant increase in LF/HF in the diet-fed SHR (6.49 ± 0.47 vs. 8.16 ± 0.59 , $p=0.0306$, $n=6$). MEMRI showed increased activation of the PVN (-0.6514 ± 0.07 vs 0.05026 ± 0.06 ; $p=0.0018$, $n=3$) and NTS ($0.1194 \pm 0.05 \pm 0.3817 \pm 0.09$; $p=0.0409$, $n=3$) in diet-fed SHR.

Conclusion: Gut microbiota plays an important role in brain-gut communication in hypertension. This presents a novel therapeutic target for treatment of hypertension.

Keywords: Hypertension; Nervous system; Fibers

Lista de abreviaturas

AGCC - Ácidos Graxos de Cadeia Curta

FOS - Frutooligossacarídeos

HA - Hipertensão arterial

HF - High frequency (alta frequência)

HPLC - High performance liquid chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência)

LCMS - Liquid chromatography-mass spectrometry (Cromatografia líquida com espectrometria de massa)

LF - Low frequency (baixa frequência)

MEMRI - *Manganese-Enhanced Magnetic Resonance Imaging* (imagem de ressonância magnética aprimorada com manganês)

NTS - Núcleo do trato solitário

PA - pressão arterial

PVN - Núcleo paraventricular

RT-PCR - *Reverse transcription polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa)

SHR - Spontaneously Hypertensive Rat (rato espontaneamente hipertenso)

SNS - Sistema Nervoso Simpático

WKY - Wistar Kyoto

Sumário

Introdução.....	13
Objetivos.....	17
Objetivos Específicos	17
Metodologia	18
Animais	18
Desenho experimental.....	18
Tabela 1 - Composição dietética	20
Peso corporal e ingestão alimentar	20
Aferição da pressão arterial pelo método caudal não invasivo	20
Modelo de gráfico de pressão arterial sistólica pelo método caudal não invasivo	21
Análise fecal: pH e extração de AGCC para cromatografia líquida de alta performance (<i>high performance liquid chromatography</i> - HPLC).....	22
Ressonância magnética reforçada com manganês (MEMRI)	23
Implantação de transmissores de telemetria, aferições da pressão arterial e análise espectral.....	25
Labirinto elevado	26
Citometria de Fluxo	27
Análise de transporte de eletrólitos na Câmara de Consumo	28
qRT-PCR.....	28
Tabela 3 - Primers utilizados.....	29
Análise Estatística	29
Resultados.....	31
Figura 1. Redução do peso corporal e ingestão alimentar após dieta rica em inulina / FOS em ratos WKY e SHR.....	31
Figura 2. O pH e a quantidade de SCFA fecais são alterados a partir da primeira semana de tratamento com dieta rica em fibras.....	33
Figura 3. Pressão arterial sistólica aumenta após seis semanas de dieta em ratos SHR e não em ratos WKY	35
Figura 4. Teste em labirinto em cruz elevado mostra um aumento no comportamento de ansiedade em SHR em comparação com WKY, mas não apresenta alterações devido a dieta FOS-AIN-93M.....	36
Figura 5. A dieta FOS-AIN-93M não altera as células do sistema imunológico.....	38
Figura 6. Pressão arterial via radiotelemetria. A dieta FOS-AIN-93M aumentou a PA de 24 horas apenas em ratos SHR.	40

Figura 7. Análise espectral da PA sistólica indica disfunção autonômica no grupo SHR alimentado com dieta FOS-AIN-93M	42
Figura 8. Dieta rica em fibras aumentou a PA em SHR sob estresse por contenção	43
Figura 9. A análise espectral sob estresse por contenção indica aumento na atividade simpática e diminuição na atividade parassimpática no grupo SHR alimentado com dieta FOS-AIN-93M.....	45
Figura 10. MEMRI em SHR mostra ativação de PVN e NTS após tratamento com dieta FOS-AIN-93M.....	46
Tabela 2 - Análise estatística das regiões cerebrais	48
Figura 11. Dados de RT-PCR.....	50
Discussão	52
Conclusão	59
Referências.....	60
Anexos.....	67
1. Apresentação de pôster em AHA Joint Scientific Sessions 2017.....	67
Poster apresentado em AHA Joint Scientific Sessions 2017	68
2. Apresentação de pôster em Experimental Biology 2018.....	69
Poster apresentado em Experimental Biology 2018.....	71

Introdução

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade em todo o mundo, sendo responsável pela morte de mais de 17 milhões de pessoas todos os anos. A hipertensão arterial (HA) é reconhecida como o principal marcador de risco para doenças cardiovasculares (Pickering GW, 1952 e Bromfield S, Muntner P, 2013). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2013), aproximadamente 970 milhões de pessoas no mundo tem HA; e as complicações decorrentes desta condição causam em torno de 9,4 milhões de mortes anualmente. Entretanto, a detecção prematura da hipertensão é muito importante para a redução dos custos e do impacto negativo que essa doença causa para a saúde pública global (Ghorbani Z, 2018).

A redução da pressão arterial (PA) diminui significativamente o risco de eventos cardiovasculares graves, doença cardíaca coronária, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca e mortalidade (Ettehad D, 2016). Apesar do progresso nas pesquisas, na detecção e no tratamento para o controle da HA, ainda existem diversos fatores relacionado a esta condição que precisam ser melhor esclarecidos. Por ser uma condição crônica e sistêmica, a HA afeta diversos tecidos do organismo. Um dos principais exemplos é a disfunção autonômica que está associada à HA (Wallin BG, 1973; Seravalle, G. Mancia, G. & Grassi, G, 2014). Indivíduos hipertensos apresentam maior ativação do Sistema Nervoso Simpático (SNS) acompanhado de uma diminuição na ativação do Sistema Nervoso Parassimpático em relação a indivíduos normotensos (da Silva AA, 2013, Grassi G e Ram VS, 2016).

A estimulação do SNS causa aumento na pressão arterial em pacientes hipertensos e normotensos devido ao envolvimento de barorreceptores e quimiorreceptores, através de mecanismos periféricos e centrais agindo no coração, rins e vasculatura periférica (Hart EC, 2016). Resumidamente, a hiperativação simpática promove um aumento do débito cardíaco, da retenção de água e da resistência vascular periférica. Esses fatores desempenham um papel fundamental na fisiopatologia da hipertensão arterial.

Além da disfunção autonômica, recentemente a hipertensão foi associada à disbiose intestinal em modelos animais e humanos (Yang T, 2015; Mell, 2015). A disbiose intestinal é caracterizada por mudanças na qualidade e quantidade de bactérias intestinais, no que diz respeito à sua atividade metabólica e sua distribuição (Sekirov I, 2010).

A disbiose intestinal é caracterizada pelo aumento na taxa de Firmicutes / Bacteroidetes e pela reduzida variedade de bactérias encontradas no intestino, bem como menor quantidade de bactérias gram negativas em relação a microbiota saudável. Além disso, a disbiose intestinal também caracteriza-se pela diminuição da quantidade de bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (Sekirov I, 2010; Zhao Y, 2013).

Os AGCC são metabólitos frutos da fermentação bacteriana dos carboidratos não digeríveis pelo hospedeiro, como os amidos resistentes, oligofrutose, inulina e fibras alimentares. Os AGCC mais abundantes são o butirato, acetato e propionato. Os AGCC, principalmente o butirato, são fonte de energia das células intestinais e também podem atuar em outros órgãos e tecidos do hospedeiro. Por exemplo, o propionato é capaz de regular a PA, enquanto que o butirato produz efeitos

benéficos em várias doenças relacionadas à disbiose intestinal (Hamaker BR e Tuncil YE 2014).

Existem muitos fatores que afetam a produção de AGCC bem como a população microbiana do intestino, como o sistema imunológico e os fatores ambientais do intestino, incluindo pH, genética do hospedeiro, sexo, idade, e dieta (De Filippo C, 2010; Hamaker BR e Tuncil YE, 2014). A dieta é a principal responsável pela modulação da composição da microbiota intestinal na vida adulta. Estima-se que a dieta seja responsável por cerca de 57% da composição microbiana (Zhang C, 2010). Hábitos alimentares têm um efeito considerável sobre a microbiota intestinal humana (Tremaroli V e Bäckhed F, 2012). Foi demonstrado que as fibras alimentares têm a capacidade de alterar pelo menos uma parte da composição da microbiota intestinal (Gibson GR, 1995). A fibra alimentar é a principal fonte de energia para as bactérias do cólon e, portanto, ela pode ser usada na manutenção ou na melhora da microbiota intestinal, particularmente quando há disbiose intestinal (Hamaker BR e Tuncil YE, 2014).

A inulina dietética e os FOS não são hidrolisados pelas enzimas dos mamíferos, mas são prontamente fermentados pela comunidade bacteriana no ceco e cólon e favorecem o crescimento de bifidobactérias intestinais (Rossi M e cols., 2005). Estes β -frutanos ocorrem em níveis elevados em plantas como chicória, aspargos, alho-poró, cebola, alho e alcachofra, e também são produzidos por *Lactobacillus spp.* em fermentações de cereais (Koleva PT e cols., 2012).

A administração de inulina e FOS na dieta tem efeitos benéficos na microbiota e, conseqüentemente na saúde de seu hospedeiro, principalmente devido ao aumento do número de bactérias como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e

aumento da produção de AGCC. A administração de fibras dietéticas têm demonstrado resultados benéficos na hiperlipidemia, colite ulcerativa, osteoporose e função imunológica (Jenkins DJ, 1999).

Devido a seus efeitos prebióticos, existe um interesse crescente na adição de diferentes fibras alimentares à dieta humana (Jeon W, 2015). No entanto, é crucial compreender os efeitos potenciais das fibras alimentares antes suplementá-las.

Objetivos

O principal objetivo desse projeto é avaliar o papel da microbiota intestinal e seus subprodutos de AGCC na modulação da pressão arterial em ratos hipertensos e em resposta ao estresse por restrição de movimento.

Objetivos Específicos

- Avaliar peso corporal e ingestão alimentar de ratos WKY e SHR submetidos a dieta rica em fibras;
- Avaliar o conteúdo fecal do cólon proximal e do ceco, quantificando AGCC e pH antes, durante e no final do tratamento com a dieta rica em fibras;
- Avaliar a pressão arterial sistólica semanalmente antes, durante e após o tratamento com dieta;
- Realizar teste comportamental em animais submetidos ao tratamento com dieta rica em fibras;
- Avaliar respostas imunes após tratamento com dieta rica em fibras antes, durante e no final do tratamento;
- Avaliar a pressão arterial sistólica, diastólica, média, frequência cardíaca, temperatura, atividade e análise espectral por 24h em animais situados em ambiente sem estresse e sem anestesia e realizar os mesmos testes nos mesmos sob estresse por restrição de movimento por um período de 20 minutos;
- Estudar as regiões cerebrais relacionadas ao controle da pressão arterial em SHR submetidos a dieta rica em fibras.

Metodologia

Animais

Duas linhagens de ratos foram utilizadas neste estudo: rato espontaneamente hipertenso (*spontaneously hypertensive rat* - SHR) e seu controle Wistar Kyoto (WKY).

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade (CEUA/IB - UNICAMP) – protocolo nº3697-1 e pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais da Universidade da Flórida (UF) (*UF Institutional Animal Care and Use Committee*). Todos os animais foram alojados individualmente em uma sala com temperatura mantida entre 22-23 graus Celsius com um ciclo luz-escuro de 12:12 horas. Os ratos foram alojados durante pelo menos um mês na instalação antes de serem usados nos experimentos descritos. Foram realizados dois experimentos independentes para observações consistentes.

Desenho experimental

Ratos machos WKY e SHR de 4 semanas de idade foram submetidos a uma dieta rica em inulina / FOS (FOS-AIN-93M) e uma dieta controle isocalórica (AIN-93M) e água *ad libitum* por 14 semanas.

Os animais foram divididos em quatro grupos. Cada grupo era composto por 6 ratos:

Grupo I: WKY dieta controle (WKY ctl)

Grupo II: WKY dieta rica em fibra (WKY fibra)

Grupo III: SHR dieta controle (SHR ctl)

Grupo IV: SHR dieta rica em fibra (SHR fibra)

Durante este período, vários parâmetros foram analisados semanalmente como peso corporal, ingestão alimentar, pressão arterial, pH fecal e AGCC nas fezes. Outros experimentos foram realizados, como ressonância magnética de Manganês (MEMRI), PA e análise espectral da PA realizados via radiotelemetria, testes comportamentais de estresse e ansiedade e citometria de fluxo para a quantificação de citocinas inflamatórias.

Após 14 semanas, os animais foram anestesiados para coleta de sangue para análise de glicemia, cetonemia e citometria de fluxo. Então os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico e os tecidos foram coletados e armazenados a -80 graus Celsius para serem analisados posteriormente. Alguns dos experimentos realizados foram: reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (*Reverse transcription polymerase chain reaction* - RT-PCR), câmara de consumo, teste de rigidez do intestino proximal, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High performance liquid chromatography*, HPLC), Cromatografia líquida com espectrômetro de massa, imuno-histoquímica (IHC) e imunofluorescência.

Tabela 1 - Composição dietética

	AIN-93M		FOS-AIN-93M	
	g%	kcal%	g%	kcal%
Proteína	14	15	13	15
Carboidrato	73	76	79	76
Gordura	4	9	4	9
Total		100		100
kcal/g	3.8		3.6	
Ingredientes				
Caseína	140	560	140	560
L-Cistina	1.8	7	1.8	7
Amido de milho	495,692	1983	425,2	1701
Maltodextrina 10	125	500	125	500
Sucrose	100	400	100	400
Celulose BW200	50	0	0	0
Inulina	0	0	80.4	121
Frutooligossacarídeos	0	0	107.3	161
Oleo de Soja	40	360	40	360
t-butilhidroquinona	0,008	0	0,008	0
Mix de minerais	35	0	35	0
Mix de vitaminas	10	40	10	40
Bitartrato de colina	2,5	0	2,5	0
Total	1000	3850	1067,3	3850

Peso corporal e ingestão alimentar

Todos os ratos e a ração foram pesados semanalmente desde o início até a 10^a semana em dieta.

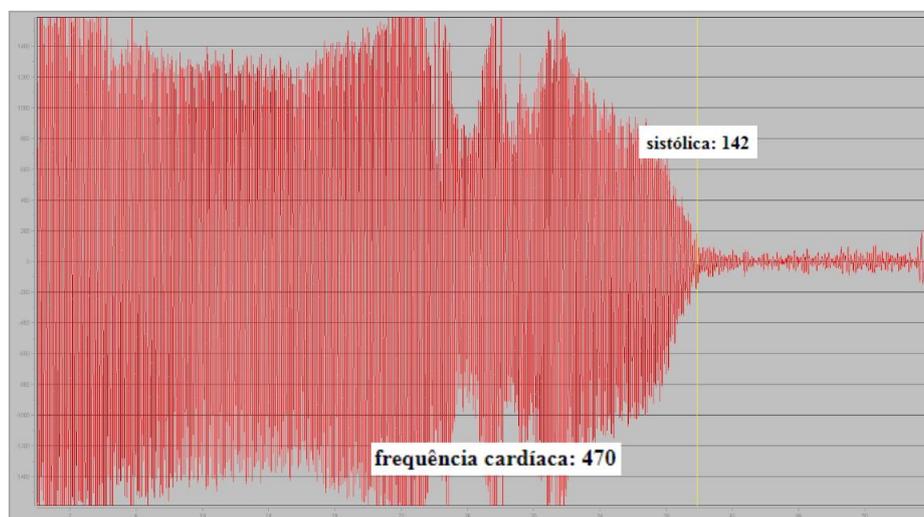
Aferição da pressão arterial pelo método caudal não invasivo

A pressão arterial sistólica foi registrada todas as semanas durante o tratamento com a dieta em ratos conscientes usando o método de aferição caudal não invasiva (Visitech BP 2000). Os animais foram treinados com o aparelho uma

semana antes do início das aferições. A primeira aferição foi realizada na semana anterior ao início da dieta (semana zero).

Para a aferição, os ratos foram colocados em um dispositivo de contenção aquecido a 37 ± 1 ° C durante 10 minutos, tempo médio para as aferições. Para cada rato, mediram-se 15 pressões sangüíneas e sua média foi tomada como pressão arterial sistólica. Cada gráfico de medição foi analisado individualmente e eles mostraram um padrão similar à figura a seguir

Modelo de gráfico de pressão arterial sistólica pelo método caudal não invasivo



O software de aferição da PA apresenta um gráfico semelhante ao modelo abaixo para cada aferição. Vários fatores podem prejudicar a aferição da PA, como: excesso de movimento do animal, temperatura inadequada do equipamento e outros fatores do ambiente de trabalho. Por este motivo, todos os gráficos de todos os animais do experimento foram analisados individualmente e aqueles que não apresentaram um padrão semelhante ao modelo abaixo foram excluídos do estudo.

Análise fecal: pH e extração de AGCC para cromatografia líquida de alta performance (*high performance liquid chromatography* - HPLC)

Em todas as semanas de intervenção dietética as fezes frescas de cada animal foram coletadas em tubos estéreis e armazenadas a -80°C imediatamente. Utilizamos 0,05 g de fezes mais 600ul de água estéril para verificar o pH. Os pHs das suspensões de fezes foram medidos usando um medidor de pH simples de mesa (Oaklon, pH 510 series).

As fezes (N = 6 / grupo) foram coletadas e os AGCCs foram extraídos conforme descrito em De Baere e cols. (2013). Adicionou-se 200 μL de HCl aos homogeneizados fecais para preservar os AGCCs voláteis e agitou-se para suspender uniformemente a massa fecal. Foram adicionados cinco mililitros de cloreto de metileno para extrair os AGCCs com uma rotação suave à temperatura ambiente durante 20 min. Após centrifugação a 3.500 rpm durante 5 min, o sobrenadante foi descartado. Quinhentos microlitros de NaOH 1N foram adicionados ao grânulo orgânico, seguido por mais 20 min de rotação suave à temperatura ambiente.

Após a centrifugação a 3500 rpm durante 5 min, a fase aquosa superior foi recolhida e misturada com 100 μL de HCl antes de ser filtrada para injeção. Foi utilizada uma alíquota de 50 μL para cada injeção. Uma curva de regressão linear padrão foi gerada para cada uma das soluções de acetato, propionato e butirato separadamente, para fins de calibração. Todas as soluções padrão foram extraídas de acordo com o método descrito acima. O desvio padrão relativo (<3,0%) foi

conseguido por injeções sequenciais de mistura padrão de 10 mM (dos três AGCCs) na fase móvel.

A separação cromatográfica foi realizada a temperatura ambiente usando o sistema HPLC Perkin Elmer Series 200 (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT), equipado com um amostrador automático, bomba quaternária e um detector UV / VIS de série 200. A coluna analítica utilizada foi Hypersil Gold aQ 150 × 4,6 mm 3 µm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). As amostras foram executadas numa combinação de duas soluções: 90% de tampão de fosfato 0,02 M de fase móvel, pH 2,2 e 10% de acetonitrilo de fase B móvel. A taxa de fluxo foi ajustada como 0,8 ml / min durante 25 min. O comprimento de onda usado para detecção foi de 210 nm.

Ressonância magnética reforçada com manganês (MEMRI)

MEMRI foi realizado em SHR após 10 semanas em dieta (n = 3 SHR ctl e n = 3 SHR fibra), como descrito recentemente (Perez et al., 2017). Dissolveu-se cloreto de manganês (II) (MnCl₂; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) em água destilada filtrada estéril antes da utilização. Vinte e duas horas antes da imagem, todos os ratos receberam uma Injeção intraperitoneal de MnCl₂ (70 mg / kg). No dia do teste, a anestesia foi inicialmente induzida sob 3-4% de isoflurano administrada em 100% de oxigênio de grau médico por 30-60 segundos (taxa de fluxo 1 L / min) e os níveis de isoflurano foram então mantidos entre 1,5-2,0% durante toda a configuração e imagens. Os ratos foram colocados em decúbito ventral em um berço de plástico com um travesseiro respiratório conectado a um transdutor de força colocado debaixo do abdômen. As temperaturas corporais foram mantidas usando um

sistema de recirculação de ar quente que recebeu feedback de uma sonda de termopar de fibra óptica (SA Instruments, Inc., New York). As taxas respiratórias foram monitoradas continuamente.

As imagens foram coletadas em um scanner 4.7 T Magnex Scientific MR controlado pelo software de console Agilent Technologies VnmrJ 3.1. Foi utilizada uma bobina de radiofrequência de transmissão / recepção em quadratura de 38 mm sintonizada para 200,6 MHz (airmri, LLC, Holden, MA). As imagens foram adquiridas usando uma seqüência de multi-eqüidade multi-fatia ponderada T1 com os seguintes parâmetros: tempo de repetição (TR) = 460 ms, tempo de eco (TE) = 16 ms, matriz de dados 256 × 256, campo de visão 25,6 × 25,6 mm, 20 fatias com 0,8 mm de espessura.

Os dados obtidos na MEMRI foram processados e analisados utilizando métodos previamente publicados (Perez et al., 2017). Resumidamente, as máscaras cerebrais foram desenhadas manualmente sobre varreduras anatômicas T1 usando a ferramenta de desenho em itkSNAP (<http://www.itksnap.org>). As máscaras foram usadas para remover o sinal não cerebral de cada varredura (incluindo a hipófise, que apresentou intensidade de sinal mais alta que poderia distorcer a distribuição das intensidades de sinal do voxel nos histogramas).

As imagens colhidas resultantes foram alinhadas com um modelo de cérebro de rato (Ekamsolutions, LLC, Holden, MA) usando a ferramenta de registro linear automatizado da Biblioteca de Software FMRIB como descrito anteriormente (Perez et al., 2017). As varreduras T1 recortadas foram convertidas em mapas de pontuação z através de um passo de processamento sinal-ruído voxel-wise. Tanto a intensidade do sinal médio global (representando a intensidade do sinal, SI) quanto

o volume (ou seja, #voxels) de ativação (representando a área de ativação de cada região) foram avaliados para cada região de interesse.

Foram avaliadas 39 regiões do cérebro, listadas na Tabela 2 em Resultados.

Implantação de transmissores de telemetria, aferições da pressão arterial e análise espectral

Na décima semana após o início da dieta, os ratos foram anestesiados com isoflurano (2-3%) e administrou-se sulfato de atropina (0,1 mg / kg) para evitar secreções excessivas nas vias aéreas. Utilizando-se técnicas assépticas, foi realizada uma laparotomia e a inserção do cateter de um transmissor de telemetria (modelo TA11PAC40; Data Sciences International, St.Paul, MN) na aorta abdominal, distal aos rins. O cateter foi fixado na aorta com uma pequena gota de adesivo de cianoacrilato e o transmissor foi fixado à parede abdominal por meio de suturas.

A pressão arterial sistólica, diastólica e média, frequência cardíaca, temperatura e níveis de atividade foram registrados por telemetria em uma medida de 24h na 12^a e 13^a semana de dieta. Também na 13^a semana, foi realizado um teste de estresse por restrição de movimento, no qual os animais foram colocados em um contensor e permaneceram imóveis por 20 minutos dentro de suas gaiolas. Durante esse período, todos os dados de telemetria foram registrados e a análise espectral foi realizada.

O poder espectral de cada componente da variabilidade da pressão arterial sistólica foi calculado em termos absolutos e em unidades normalizadas. A razão

entre os componentes LF e HF (LF / HF) foi calculada para quantificar o equilíbrio simpátovagal cardíaco.

Séries temporais de pressão arterial sistólica de repouso e intervalo de pulso foram utilizados para analisar a variabilidade da pressão e da FC, conforme descrito anteriormente (Japundzic et al., 1990; Eckberg, 1997). A densidade espectral de potência para baixa frequência (LF, 0,20–0,75 Hz, indicando principalmente a atividade simpática para vasos e modulação simpática + parassimpática do coração) e domínio de alta frequência (HF, 0,75 a 3,0 Hz, indicativo da atividade vagal para o coração) foram obtidos por meio da integração da densidade do espectro de potência em cada largura de banda de frequência, utilizando um procedimento personalizado (MATLAB6.0, Mathworks, Natick, MA, EUA. Ceroni et al., 2009; Masson et al., 2014).

A razão LF / HF para o coração e a sensibilidade barorreflexa espontânea através dos índices α LF e α HF (representando a sensibilidade do barorreflexo nas bandas LF e HF, respectivamente, Laude et al., 2004; Martelli et al., 2014) também foram avaliadas.

Labirinto elevado

O Labirinto em Cruz Elevado (Stoelting, Wood Dale, IL) consiste em um aparato em forma de "+" com dois braços abertos e dois fechados, elevados do chão em ~ 60 centímetros. Os braços possuem aproximadamente 10 cm de largura e ~ 45 cm de comprimento. Para todos os animais (n = 6 / grupo), o teste do labirinto em cruz elevado foi iniciado com o animal sendo colocado na interseção dos quatro braços do labirinto, de frente para um braço aberto. Toda a

movimentação do animal no equipamento foi monitorada e quantificada pelo software de rastreamento Any-Maze Video (Stoelting). Após 5 min de monitorização do Labirinto em Cruz Elevado, os animais foram devolvidos às suas gaiolas.

Citometria de Fluxo

O sangue foi coletado da veia caudal uma semana antes do início da dieta e após 3, 5, 10 e 14 semanas em dieta. Para a classificação de células ativadas por fluorescência (fluorescence-activated cell sorting -FACS), células mononucleares circulantes do sangue foram preparadas em uma concentração de $0.5-1 \times 10^6$ células/100 μ l de salina tamponada com fosfato (phosphate buffered saline - PBS) + 2% soro bovino fetal + 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (ethylenediamine tetraacetic acid - EDTA), como descrito anteriormente por Zubcevic J (2014). Para identificar a população e a ativação celular por citometria de fluxo, uma suspensão de células sangüíneas foi submetida a uma marcação tripla com um coquetel de anticorpos: anti-CD4 conjugado com FITC (BioLegend), anti-CD25 conjugado com APC (eBioscience), anti-CD5 conjugado com FITC (BDBiosciences), anti-CD8a conjugado com APC (BioLegend), anti-CD3 conjugado com APC (BioLegend), anti-CD45 conjugado com APC (eBioscience), CD68 conjugado com anti-rat AF647, anti-IL-17a conjugado com APC (eBioscience), anti-FOXP3 conjugado com APC (eBioscience). Os dados foram adquiridos num citômetro de fluxo LSRFortessa (BD Biosciences) e analisados utilizando o software FACSDiva (BD Biosciences).

Os painéis de anticorpos marcam as seguintes populações:

CD4+ CD25+	Células T reguladoras
CD5+ CD8-	Linfócitos intra epiteliais intestinais

CD3+ CD45+	Linfócitos T
CD68	Monocitos e Macrófagos
CD4+ IL17+	Linfócitos T auxiliares que secretam IL17
CD4+ FOXP3	Linfócitos T reguladores

Análise de transporte de eletrólitos na Câmara de Consumo

Cólon proximal de 3 ratos por grupo foram coletados, abertos e cuidadosamente montados em Câmaras de Consumo e banhados em ambas as superfícies com solução tampão de Krebs modificada. A solução tampão de Krebs-Ringer foi preparada a 38° C para ter uma temperatura de 37° C nas câmaras de Consumo. No lado apical da câmara foi adicionado 1M de butirato. Após cerca de 1 hora, soluções apicais e basolaterais foram coletadas para se analisar a quantidade de butirato em ambos os lados.

qRT-PCR

Foram analisados os níveis de expressão de mRNA de genes associados a transportadores de AGCC, receptores olfatórios e vias inflamatórias no cólon proximal dos animais. Para isso, os tecidos foram conservados em Trizol (Life Tech) e mantidos a -80 graus celsius até o uso. Posteriormente foi utilizado o protocolo descrito pelo fabricante para a extração de RNA total. A quantificação total de RNA foi realizada usando um dispositivo Nanodrop-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Duzentos nanogramas de RNA total de cada amostra foram transcritos reversamente em DNA complementar (cDNA) usando Kit de Alta

Capacidade de RNA-para-cDNA (Applied Biosystems). Quantificamos os níveis de expressão de mRNA de ffar2, ffar3, MCT1, MCT4, IL17, TNFalfa, cingulina, ocludina e Bifidobacterium; GAPDH e 16s foram usados como controles. Um sistema StepOnePlus® (Applied Biosystems) foi usado para realizar experimentos de PCR.

Tabela 3 - Primers utilizados

Proteína		Sequencia 5'-3'
Ffar2	sentido	GGCTTCGGCTTCTACAGCAGTATCT
	anti-sentido	TCCAAAGCACACCAGGAAATTAAGA
Ffar3	sentido	CTACAACGTGTCCCATGTCCG
	anti-sentido	TTCTGCTCCTTCAGCTCCAT
MCT1	sentido	GTGACTGGTCGGTCGTGTAG
	anti-sentido	GCAGGTGGCATCTTAGGTGT
MCT4	sentido	CCAGCATGCTCCTAAGACCT
	anti-sentido	GCGGTTTGGTGTTTCTGTCT
IL17	sentido	ACAGTGAAGGCAGCGGTA
	anti-sentido	GAGTCCAGGGTGAAGTGGAA
TNFalfa	sentido	AGTCCGGGCAG GTCTACTTT
	anti-sentido	CGTGTGTTTCTGAGCATCGT
Cingulina	sentido	CTCAAGGACCTGGAATACGAGC
	anti-sentido	TCCGAGAGCAAATCCGAGTT
Ocludina	sentido	AAGACGATGAGGTGCAGAAG
	anti-sentido	GTGAAGAGAGCCTGACCAA
<i>Bifidobacterium</i>	sentido	GGGATGCTGGTGTGGAAGAGA
	anti-sentido	TGCTCGCGTCCACTATCCAGT
GAPDH	sentido	CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA
	anti-sentido	GGCATGGACTGTGGTCATGA
Bacterial 16S	sentido	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
	anti-sentido	AAGGAGGTGWTCCARCC

Análise Estatística

Os dados são expressos como média \pm EPM e analisados utilizando ANOVA de um ou dois fatores com medidas repetidas (Graphpad Prism La Jolla, USA). O

teste post hoc de Bonferroni foi utilizado para comparações entre grupos. Em nossa apresentação dos resultados, as mudanças são consideradas significativas somente se forem estatisticamente significativas em um nível de $P < 0,05$.

Resultados

Figura 1. Redução do peso corporal e ingestão alimentar após dieta rica em inulina / FOS em ratos WKY e SHR

Apenas uma semana após o início da dieta, tanto o peso corporal como a ingestão alimentar de ambos WKY e SHR começou a apresentar redução. As figuras 1A-D mostram que as alterações no peso corporal foram significativas em ambas as linhagens. Acompanhando esse resultado, as figuras 1E-F apresentam os dados de ingestão alimentar semanal e cumulativa.

Figura 1.

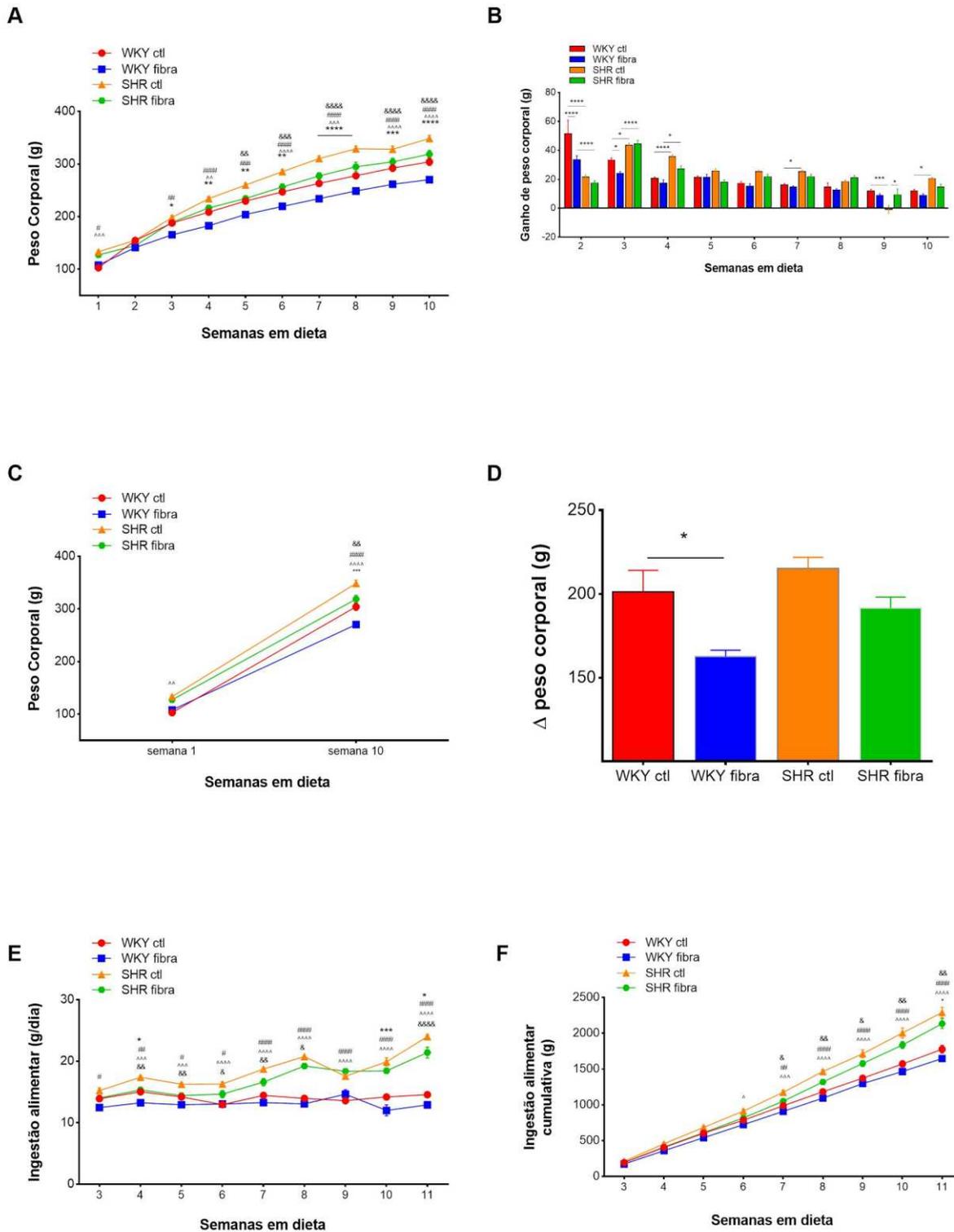


Figura 1. Peso corporal (g) (A), Ganho de peso corporal durante as dez primeiras semanas em dieta (g) (B), Peso corporal antes e depois de 10 semanas em dieta (g) (C), Variação de peso corporal (D),

Ingestão alimentar semanal (g) (E), Ingestão alimentar cumulativa (F), WKY ctl (n=6), WKY fibra (n=6), SHR ctl (n=6) and SHR fibra (n=7). O peso corporal e a ingestão de alimentos foram medidos semanalmente a iniciando a partir de uma semana antes do início da dieta até a 10ª semana em dieta. Barra de erro = erro padrão. WKY CTL vs WKY FIBRA: *, WKY FIBRA vs SHR FIBRA: #, WKY CTL vs SHR CTL: ^, SHR CTL vs SHR FIBRA: &; * p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001.

Figura 2. O pH e a quantidade de SCFA fecais são alterados a partir da primeira semana de tratamento com dieta rica em fibras

A dieta com inulina / FOS diminuiu o pH das fezes a partir da primeira semana da dieta (figura 2A). O pH dos AGCC é baixo e, como a dieta promove um aumento na produção desses metabólitos, o pH das fezes tende a diminuir drasticamente durante o tratamento dietético.

Existe uma dificuldade em se quantificar AGCCs nas fezes porque as fibras alimentares também alteram a consistência das fezes, tornando-as mais líquidas e dificultando a quantificação de AGCC / g de fezes. Porém, pode-se observar em alguns pontos que houve grande aumento na quantidade de butirato, acetato e propionato nas fezes dos animais alimentados com dieta rica em fibras (figuras 2B-D).

Não houve alteração na glicose, cetonas e butirato séricos (figuras 2E-G).

Figura 2.

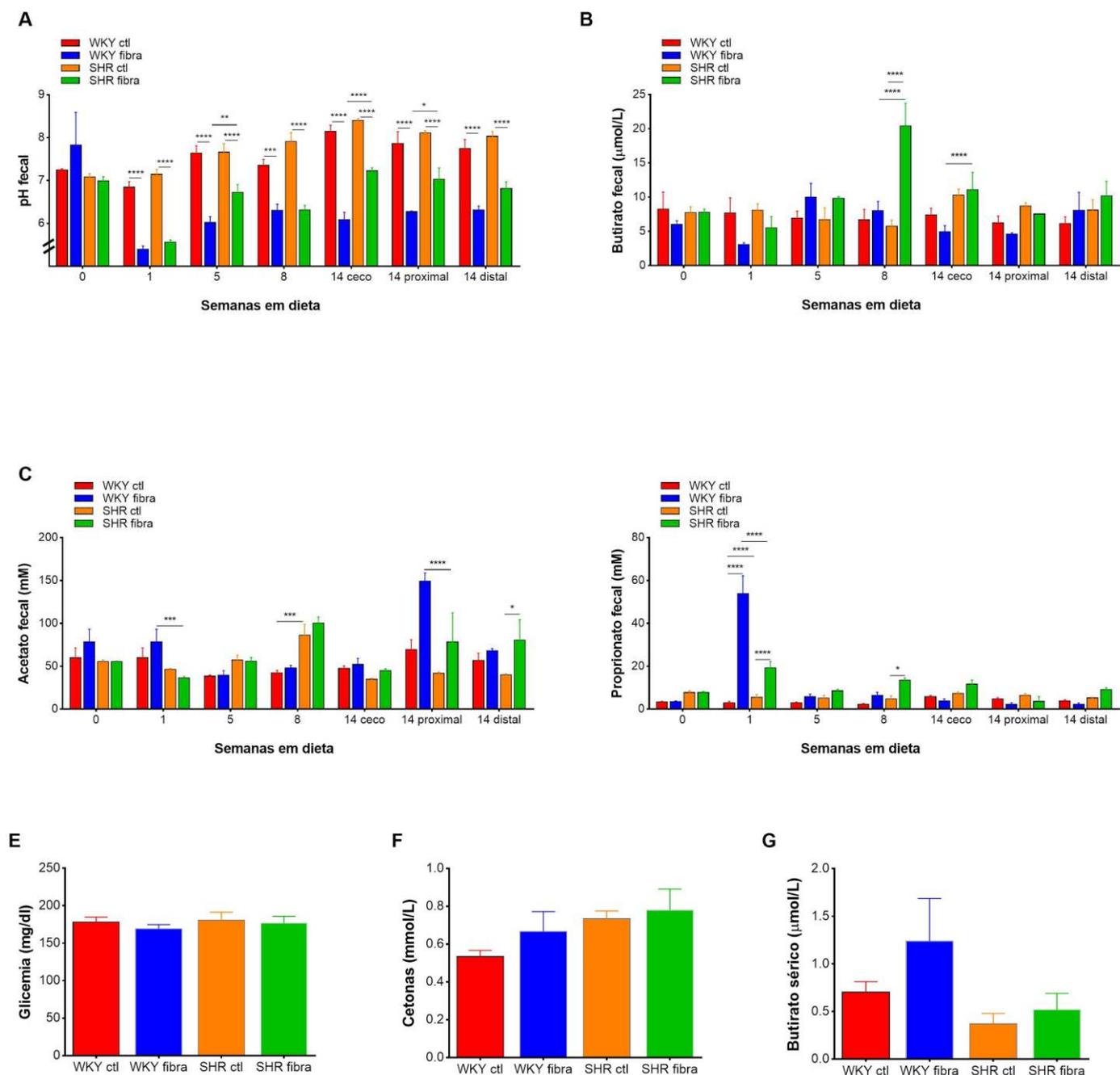


Figura 2. pH fecal (A), Butirato fecal (B), Acetate fecal (C), Propionate fecal (D), Glicose Sérica (E), Cetonas séricas (F), Butirato sérico (G). Barra de erro = erro padrão. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. $n = 6$ /grupo.

Figura 3. Pressão arterial sistólica aumenta após seis semanas de dieta em ratos SHR e não em ratos WKY

A medida da pressão arterial aferida pelo método caudal não-invasivo foi realizada semanalmente desde uma semana antes do início da dieta. Após algumas semanas de tratamento, observou-se uma tendência de aumento da PA em ratos SHR, enquanto que os ratos WKY em dieta FOS-AIN-93M permaneceram com sua PA sistólica semelhantes ao grupo controle AIN-93M (figura 3A).

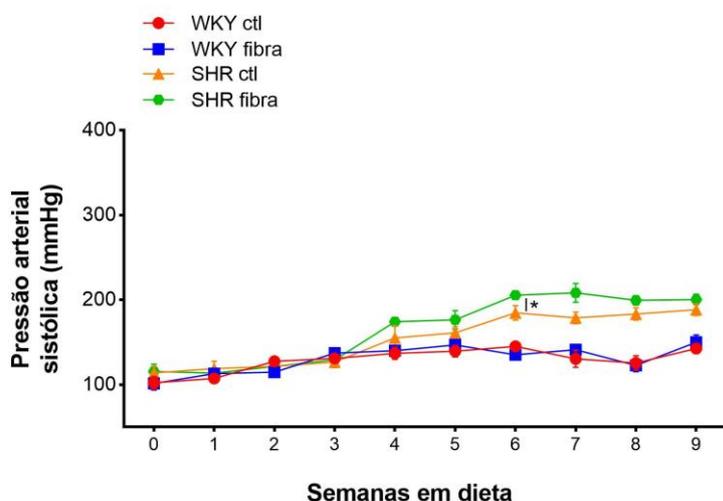


Figura 3

Figura 3. Pressão arterial sistólica (mmHg) (A). Barra de erro = erro padrão. * $p < 0.05$. $n = 6$ /grupo.

Figura 4. Teste em labirinto em cruz elevado mostra um aumento no comportamento de ansiedade em SHR em comparação com WKY, mas não apresenta alterações devido a dieta FOS-AIN-93M.

Neste teste, a ansiedade é medida pelo tempo que o animal permanece nos braços abertos e fechados do labirinto e pelo tempo móvel e imóvel, bem como a distância percorrida. Quanto maior a distância percorrida, e quanto maior o tempo em movimento e tempo gasto no braço aberto, significam que o instinto natural exploratório dos roedores está preservado. Por outro lado, quando os animais apresentam certos níveis de ansiedade eles vão permanecer a maior parte do tempo parados e/ou se abrigando nos braços fechados do labirinto.

Não houve diferença na distância percorrida pelos animais (Figura 4A). Os animais WKY tiveram maior mobilidade durante os testes quando comparados com os SHR (Figura 4B-C). Além disso, os WKY permaneceram mais tempo nos braços abertos e menos tempo nos braços fechados, o oposto ocorreu nos grupos SHR (Figura 4D-E). Não houve diferença entre os grupos tratados com as dietas AIN-93M e FOS-AIN-93M.

Figura 4

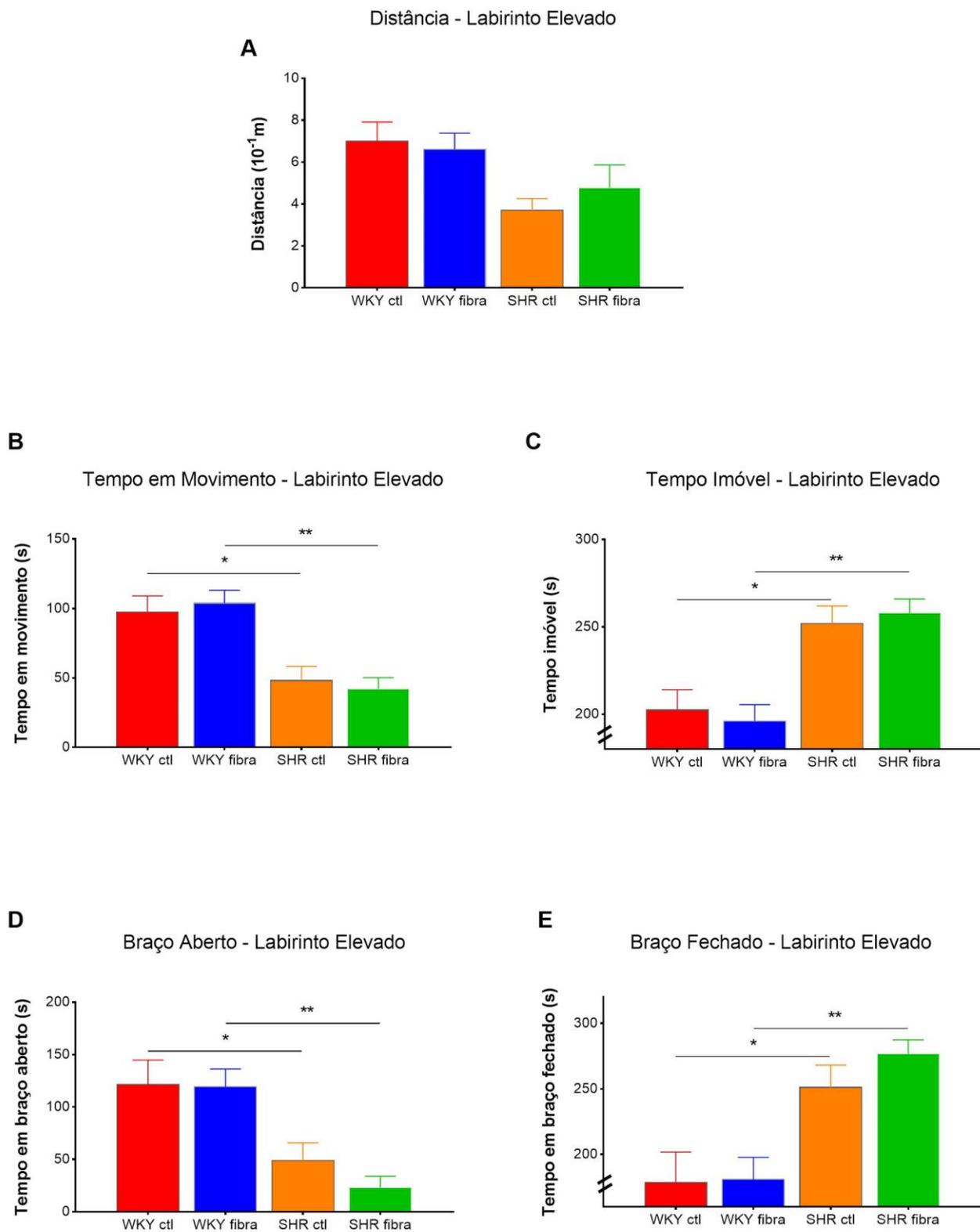


Figura 4. Distância total percorrida (A), Tempo móvel (B), Tempo imóvel (C), Tempo em braços

abertos (D), Tempo em braços fechados (E). Barra de erro = erro padrão. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.
n=6/grupo.

Figura 5. A dieta FOS-AIN-93M não altera as células do sistema imunológico

Não houve diferenças entre os grupos tratados com dieta controle e dieta rica em fibras. Porém, é possível observar que os animais SHR apresentam um maior número de células pró-inflamatórias do que os ratos WKY normotensos (Figura 5A-G).

Figura 5.

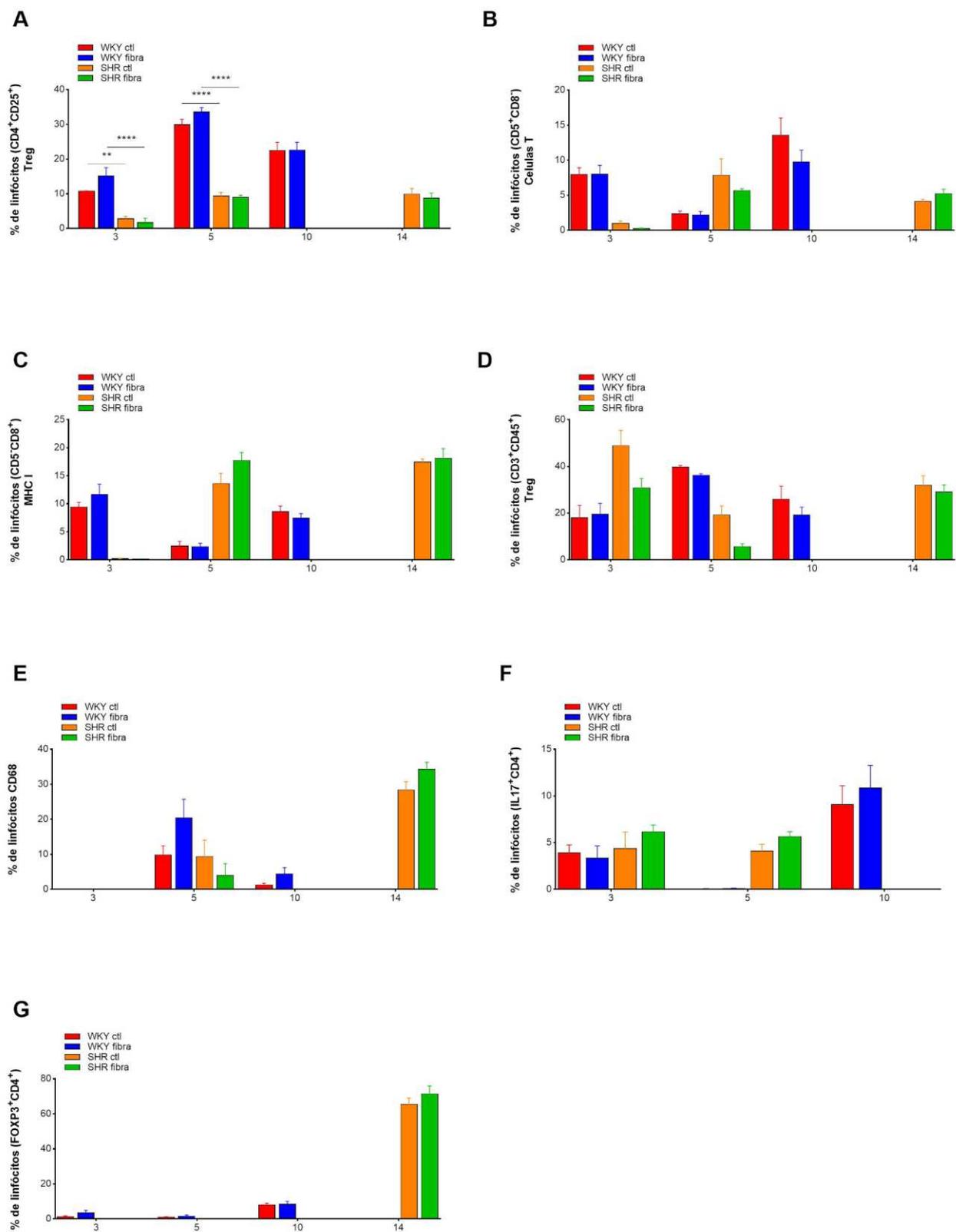


Figura 5. Combinacao de anticorpos para citometria de fluxo CD4+CD25+ (A), CD5+CD8- (B), CD5-

CD8+ (C), CD3+CD45+ (D), CD68 (E), IL17+CD4+ (F), FOXP3+CD4+ (G). Barra de erro = erro padrão. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. $n = 6$ /grupo.

Figura 6. Pressão arterial via radiotelemetria. A dieta FOS-AIN-93M aumentou a PA de 24 horas apenas em ratos SHR.

Na décima segunda e décima terceira semanas em dieta foram realizadas as aferições de PA via radiotelemetria. Esse tipo de aferição permite que haja um monitoramento contínuo pelo período de 24 horas. Conforme esperado, a PA e a FC nos ratos SHR é significativamente maior do que em WKY, entretanto, a PA de ratos SHR alimentados com dieta FOS-AIN-93M foi exacerbada em alguns horários (Figura 6A, C, E e G) e esse dado foi confirmado quando foi feita a média das 24h (Figura 6B, D e F).

A temperatura corporal também sofreu alterações devido a dieta. Em todos os testes realizados foi observada uma redução significativa na temperatura corporal dos animais SHR que receberam dieta FOS-AIN-93M (figura 6H-I).

Os níveis de atividade não apresentaram relação com o aumento da PA e FC (Figura 6J). Surpreendentemente, o aumento da PA sistólica, diastólica e média no grupo SHR FOS-AIN-93M foi significativamente alterado no período de repouso dos animais.

diastólica (D), Pressão arterial média (E), Média de 24h da PA média (F), Frequência cardíaca (G), Temperatura (H), Média de 24h da temperatura (I), Níveis de atividade (J). Barra de erro = erro padrão. WKY CTL vs WKY FIBRA: *, WKY FIBER vs SHR FIBRA: #, WKY CTL vs SHR CTL: ^, SHR CTL vs SHR FIBRA: &; * p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001. n=6/grupo.

Figura 7. Análise espectral da PA sistólica indica disfunção autonômica no grupo SHR alimentado com dieta FOS-AIN-93M

A análise espectral derivada da pressão arterial sistólica mostrou um aumento na disfunção autonômica em SHR alimentados com dieta rica em fibras FOS-AIN-93M. Essa disfunção é caracterizada pelo aumento na onda de baixa frequência - LF - (relacionada à atividade simpática) e uma diminuição onda de alta frequência - HF - (relacionada à atividade parassimpática). Não houve diferença significativa entre os grupos na frequência de onda relacionada a atividade simpática (LF) (Figura 7A). E na frequência de onda indicativa de atividade parassimpática (HF) houve apenas um momento em que o grupo WKY alimentado com dieta controle AIN-93M apresentou maior atividade parassimpática quando comparado com WKY alimentado com dieta rica em fibras FOS-AIN-93M (Figura 7B). A relação LF / HF é aumentada em SHR em relação aos WKY, pois já é sabido que os animais SHR possuem maior atividade mas a dieta não causou alterações na função autonômica em nenhuma das cepas (Figura 7A-D). A função miogênica é diminuída após a dieta tanto em WKY quanto em SHR (Figura 7E).

Figura 7.

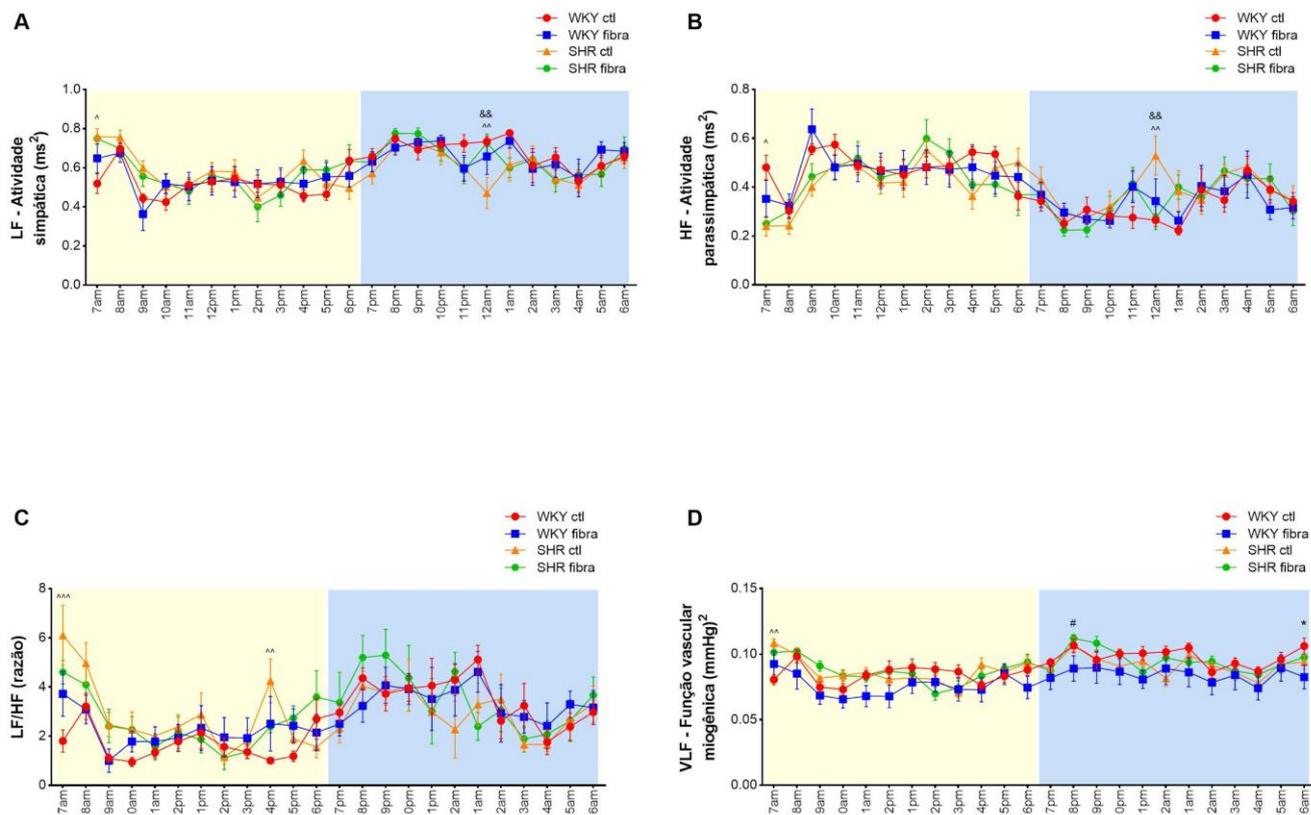


Figure 7. LF Atividade simpática (A), HF Atividade parassimpática (B), razão LF/HF (C), Média de 24h da razão LF/HF (D), VLF Função miogênica (E), Média de 24h da função miogênica VLF (F). Barra de erro = erro padrão. WKY CTL vs WKY FIBRA: *, WKY FIBRA vs SHR FIBRA: #, WKY CTL vs SHR CTL: ^, SHR CTL vs SHR FIBRA: &; * p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001. n=6/grupo.

Figura 8. Dieta rica em fibras aumentou a PA em SHR sob estresse por contenção

Em 20 minutos sob estresse por contenção, observamos um aumento na pressão arterial diastólica e média no grupo SHR alimentado com dieta FOS-AIN-93M. No grupo WKY em dieta rica em fibras houve uma tendência de aumento da

PA mas não houve significância estatística (Figura 8A-C). A FC também indicou uma tendência ao aumento em ambas as espécies alimentadas com a dieta rica em fibras (Figura 8D). A temperatura não foi alterada durante este experimento, porém (Figura 8E).

Figura 8.

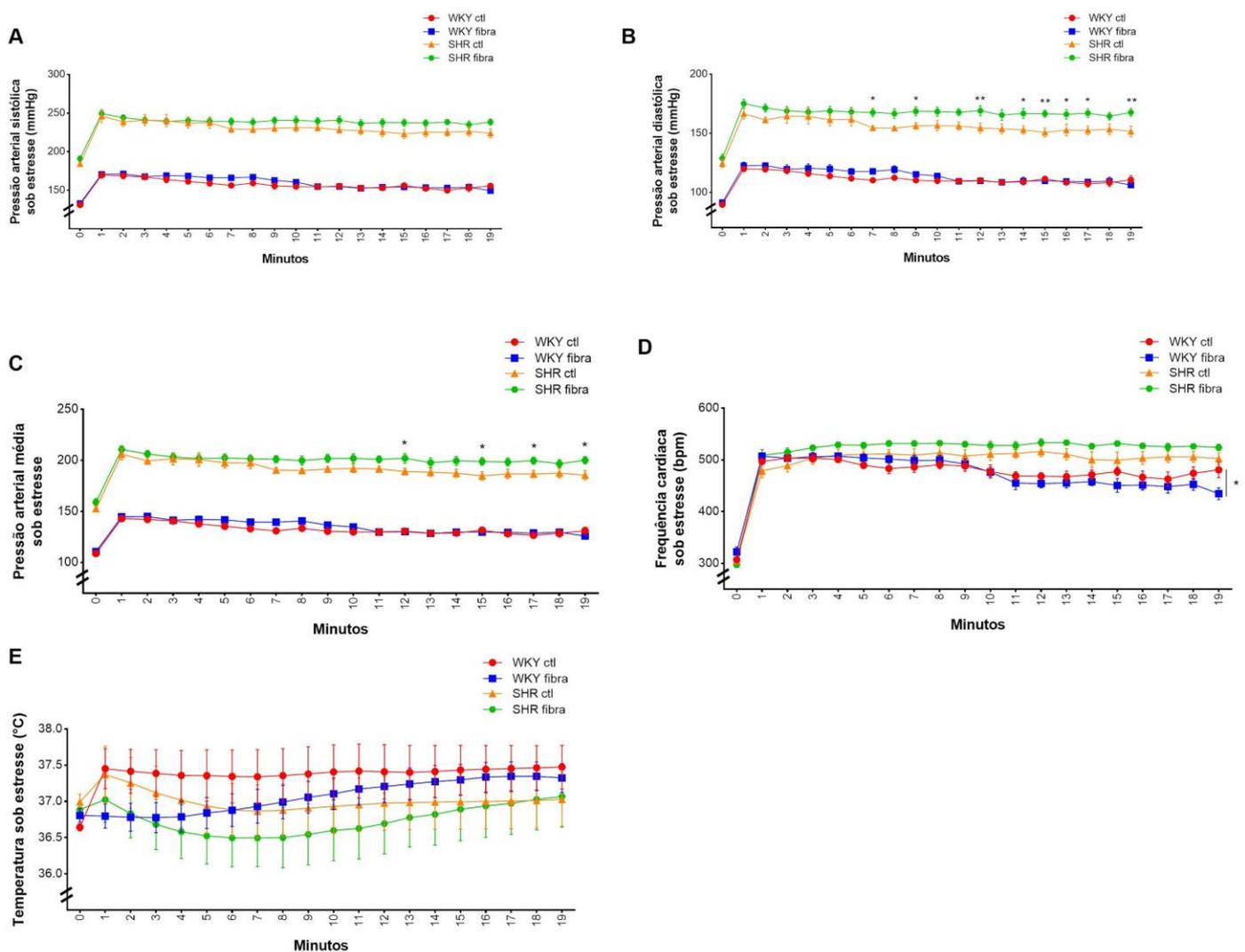


Figura 8. Todos os seguintes dados foram obtidos sob estresse por contenção por um período de 20 minutos. PA sistólica (A), PA diastólica (B), PA média (C), Frequência cardíaca (D), Temperatura (E). Barra de erro = erro padrão. WKY CTL vs WKY FIBRA: *, WKY FIBRA vs SHR FIBRA: #, WKY CTL

vs SHR CTL: ^, SHR CTL vs SHR FIBRA: &; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.
n=6/grupo.

Figura 9. A análise espectral sob estresse por contenção indica aumento na atividade simpática e diminuição na atividade parassimpática no grupo SHR alimentado com dieta FOS-AIN-93M

Os resultados da figura 7 indicam que ratos SHR apresentam disfunção autonômica, com aumento na taxa LF / HF. Essa alteração foi exacerbada durante o teste de estresse por contenção. Em diversos momentos do experimento foi observado um aumento na atividade simpática, segundo a onda LF da análise espectral (Figura 9A). De maneira complementar, a atividade parassimpática (HF) também apresentou alterações, sendo reduzida em animais SHR alimentados com dieta rica em fibras (Figura 9B). A taxa LF / HF, entretanto, foi menor em SHR tratados com a dieta FOS-AIN-93M quando comparado com seu grupo controle SHR AIN-93M (Figura 9C). Em determinados momentos, os animais WKY também apresentaram resultados semelhantes aos SHR, porém em menor grau. Neste experimento de estresse por contenção não houve alterações no indicador de função miogênica VLF (Figura 9D).

Figura 9.

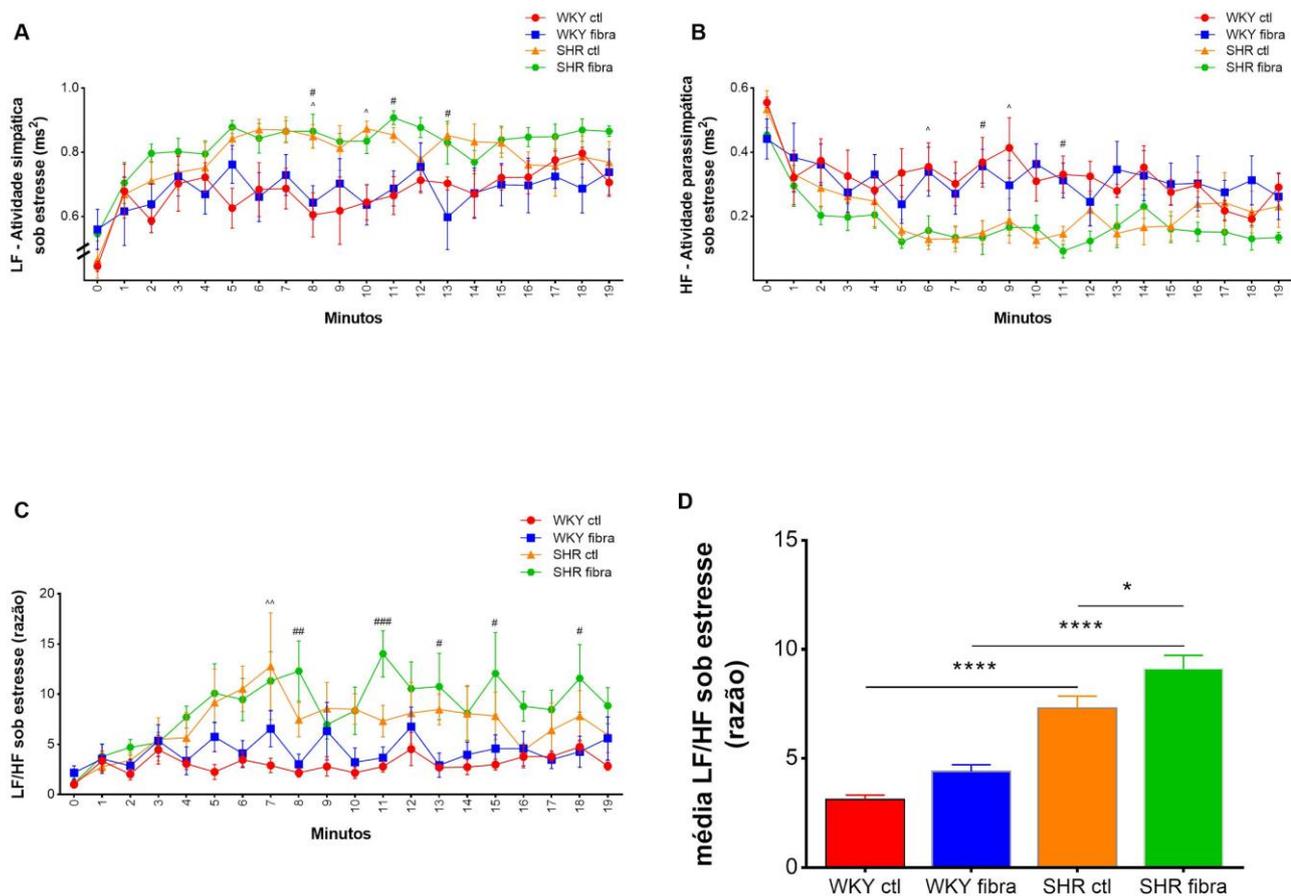


Figura 9. Todos os seguintes dados foram obtidos sob estresse por contenção por um período de 20 minutos. LF atividade simpática (A), HF atividade parassimpática (B), Razão LF/HF ©, média da razão LF/HF (D). Barra de erro = erro padrão. WKY CTL vs WKY FIBRA: *, WKY FIBRA vs SHR FIBRA: #, WKY CTL vs SHR CTL: ^, SHR CTL vs SHR FIBRA: &; * p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001. n=6/grupo.

Figura 10. MEMRI em SHR mostra ativação de PVN e NTS após tratamento com dieta FOS-AIN-93M

Foram analisadas 39 regiões cerebrais, listadas na Tabela 2 e algumas delas apresentaram-se mais ativas em relação ao grupo controle SHR AIN-93M. As

regiões que apresentaram alterações são reconhecidas por atuarem no controle cardio pressórico, como em CA2 (*Cornu Ammonis 2*, localizado no hipocampo), região cinzenta central, núcleo paraventricular, tálamo cinzento periaquedutal e núcleo do trato solitário (Figura 10A-F).

Tabela 2 - Análise estatística das regiões cerebrais

Regiões	SHRctl	SHR fibra	p	significância
área cinzenta central	-0.2641 ± 0.09364	0.07647 ± 0.06918	0.0201	*
área hipotalâmica anterior	0.1022 ± 0.1434	0.1231 ± 0.1160	0.9119	ns
área hipotalâmica posterior	0.1146 ± 0.04935	0.2202 ± 0.04758	0.1546	ns
CA1 dorsal	0.2087 ± 0.04605	0.3157 ± 0.03230	0.0862	ns
CA1 hipocampo ventral	-0.07065 ± 0.08372	0.07195 ± 0.06440	0.2068	ns
CA2	-0.7963 ± 0.2327	-0.1563 ± 0.08363	0.027	*
CA3 dorsal	-0.09456 ± 0.1364	0.1943 ± 0.03165	0.0661	ns
CA3 hipocampo ventral	-0.4167 ± 0.05971	-0.2333 ± 0.07079	0.0759	ns
hipotálamo lateral	0.5426 ± 0.05566	0.4927 ± 0.06145	0.561	ns
lobo pituitário anterior	1.035 ± 0.8390	0.8691 ± 0.8619	0.8933	ns
lobo pituitário neural	-0.2647 ± 0.1729	0.1294 ± 0.1684	0.8933	ns
locus ceruleus	0.1449 ± 0.07719	0.3282 ± 0.1203	0.2288	ns
núcleo amigdalóide anterior	-0.05994 ± 0.2084	-0.3517 ± 0.1916	0.327	ns
núcleo amigdalóide basal	0.1779 ± 0.02885	0.2369 ± 0.05609	0.3721	ns
núcleo amigdalóide central	0.3365 ± 0.05249	0.3420 ± 0.05324	0.9424	ns
núcleo amigdalóide cortical	-0.3917 ± 0.1049	-0.3253 ± 0.07717	0.621	ns
núcleo amigdalóide intercalado	0.3978 ± 0.1378	0.3558 ± 0.1051	0.8133	ns
núcleo amigdalóide lateral	-0.3400 ± 0.1808	-0.1889 ± 0.1279	0.5107	ns
núcleo amigdalóide medial	0.08161 ± 0.06979	0.001556 ± 0.1116	0.5567	ns
núcleo anterior pretecal	0.6935 ± 0.02636	0.6151 ± 0.06722	0.3414	ns
núcleo da stria terminalis	-0.03772 ± 0.06050	-0.005375 ± 0.06757	0.7306	ns
núcleo do trato solitário	0.1194 ± 0.05286	0.3817 ± 0.09855	0.0409	*
núcleo medial ventral	0.2231 ± 0.08752	0.2864 ± 0.08274	0.611	ns
núcleo mediano da rafe	0.7957 ± 0.04131	0.7993 ± 0.03979	0.9514	ns
núcleo olfatório anterior	0	0	-	-
núcleo parabraquial	0.4998 ± 0.03363	0.6118 ± 0.04518	0.082	ns
núcleo paraventricular	-0.6514 ± 0.07234	0.05026 ± 0.06111	0.0018	**
núcleo reticular	0.1940 ± 0.1088	0.2875 ± 0.08673	0.5169	ns
núcleo reticular do mesencéfalo	0.6480 ± 0.03464	0.6865 ± 0.02315	0.3823	ns
núcleo septal lateral	-0.2004 ± 0.1471	-0.1074 ± 0.1345	0.6507	ns
núcleo supramamilar	0.4254 ± 0.06672	0.3254 ± 0.1086	0.4507	ns
núcleo supraóptico	0.4403 ± 0.05879	0.4080 ± 0.05907	0.7064	ns
núcleo supraquiasmático	-1.125 ± 0.2049	-0.8293 ± 0.1371	0.2579	ns
rafe dorsal	-0.3917 ± 0.1049	-0.3253 ± 0.07717	0.3179	ns
rafe linear	0.4963 ± 0.1209	0.4951 ± 0.1469	0.9954	ns
rafe magnus	0.3150 ± 0.08363	0.4551 ± 0.1009	0.3102	ns
substância negra compacta	0.5275 ± 0.03994	0.5133 ± 0.01378	0.7459	ns
tálamo periaqueductal cinzento	0.1200 ± 0.02695	0.2626 ± 0.03452	0.0116	*
ventrículo	-1.080 ± 0.06942	-0.8773 ± 0.07869	0.09	ns

Figura 10.

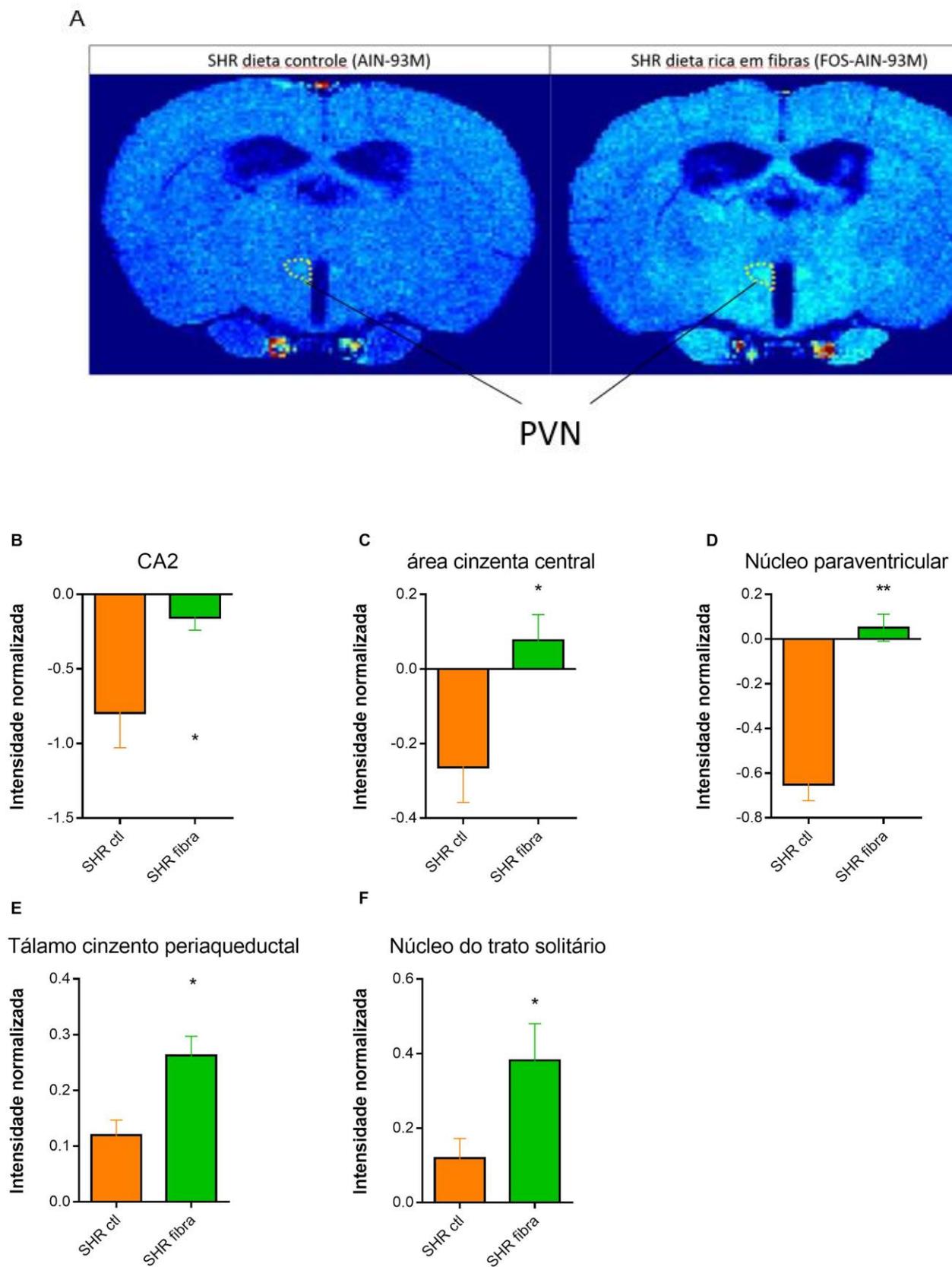


Figura 10. Imagem de MEMRI do núcleo paraventricular (A), quantificação de intensidade em regiões cerebrais: CA2 (B), cinzenta central (C), núcleo paraventricular (D), tálamo cinzento periaqueductal (E), núcleo do trato solitário (F). Barra de erro = erro padrão. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. $n = 3$ /grupo.

Figura 11. Dados de RT-PCR

Diversos primers foram testados no cólon proximal e em outros tecidos (dados não incluídos) e, via PCR, é possível observar uma diminuição da expressão de FFAR2 em animais SHR tratados com dieta rica em fibras em comparação com a WKY tratados com a mesma dieta (Figura 11A-B). Algumas proteínas inflamatórias não sofreram alterações no cólon proximal, corroborando com dados de citometria de fluxo (Figura 11C-D).

Houve um aumento na expressão da proteína de junção Cingulin apenas no grupo WKY FOS-AIN-93M e não houve alteração na expressão de Occludin, também uma proteína de junção (Figura 11E-F). O conteúdo cecal de *Bifidobacterium* aumentou após dieta rica em fibras FOS-AIN-93M, mostrando que a dieta promoveu alterações na microbiota intestinal (Figura 11G).

Figura 11.

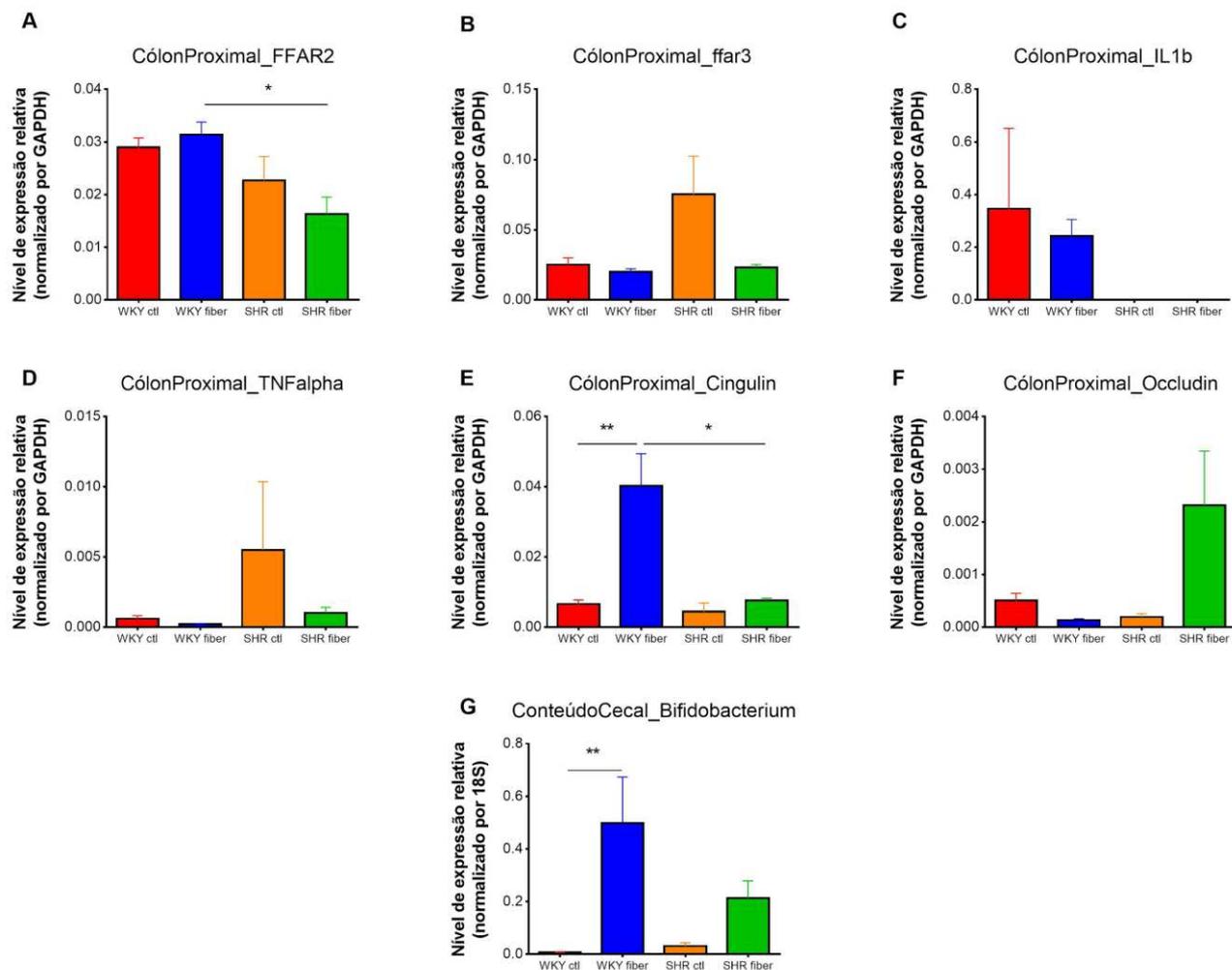


Figura 11. Resultados de RT-PCR em cólon proximal: Transportador de AGCC ffar2 (A) e ffar3 (B), fatores inflamatórios IL1beta (C), TNFalpha (D), proteínas de junção Cingulin (E) e Occludin (F), e conteúdo cecal de Bifidobacterium (G). Barra de erro = erro padrão. * p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001. n=6/grupo.

Discussão

A prevalência de hipertensão cresce em proporções alarmantes no mundo, revelando um quadro epidemiológico preocupante (Campbell NRC and Niebylski ML, 2014). Globalmente, se tornam cada vez mais necessárias as ações para prevenção e controle de doenças crônicas não transmissíveis, incluindo a hipertensão arterial. No Brasil, o Sistema Único de Saúde promove diversos programas com objetivo de reduzir a incidência de HA atuando tanto no tratamento como na prevenção da doença. A promoção de alimentos saudáveis também está sendo amplamente discutida no campo da saúde pública brasileira, conforme o novo Guia Alimentar para a População Brasileira (Ministério da saúde, 2014)

A ingestão de fibras alimentares traz benefícios para a manutenção da saúde e prevenção de doenças. Exceto em certas situações terapêuticas, a fibra alimentar deve ser obtida através do consumo de alimentos como frutas minimamente processadas, vegetais, leguminosas e grãos inteiros. A preferência por tais alimentos pode ter um impacto significativo na prevenção e tratamento da obesidade, doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2, bem como a constipação, entre outros (Marlett JA, 2002).

Foi comprovado o efeito das fibras alimentares no aumento da saciedade e, conseqüentemente, na redução da ingestão alimentar e peso corporal. Desta forma, conforme esperado, houve redução de peso corporal e ingestão alimentar em ambas as espécies submetidas a dieta rica em fibras (Figura 1A-F). As fibras alimentares são conhecidas por promover saciedade sem alterar a palatabilidade da dieta (Rasoamanana R, 2013). Os animais SHR apresentam peso corporal e ingestão alimentar significativamente mais elevados do que os WKY em todos os

momentos do experimento, este dado já era esperado pois os SHR tendem a ser mais pesados do que seu controle WKY (Doyle L e Cashman KD, 2007).

A introdução da dieta rica em fibras FOS-AIN-93M foi capaz de reduzir significativamente o pH das fezes logo na primeira semana de tratamento. Tanto os animais WKY como os SHR apresentaram resultado semelhante. A redução do pH foi atribuída a um aumento na quantidade de AGCC no intestino destes animais, já que a produção de AGCC depende da fermentação das fibras dietéticas pelas bactérias intestinais (Petry N, 2012).

No ceco e cólon proximal observou-se que o pH de SHR fibra foi maior em relação ao WKY fibra na quinta e décima semana em dieta. Este dado pode indicar que a produção de AGCC pode ter sido ainda mais elevada em WKY do que em SHR. Tanto a inulina (Ramirez-Farias C, 2012) quanto os FOS (Li S, 2015) podem causar um aumento na população de Bifidobacterium, dentre outras bactérias consideradas benéficas para seu hospedeiro. A Figura 11 G mostra que houve um aumento significativo na quantidade de Bifidobacterium na microbiota de animais WKY em dieta FOS-AIN-93M, mas no grupo SHR que recebeu a mesma dieta não houve mudança significativa, apesar de ter também havido uma tendência ao aumento. Portanto, a dieta modulou a microbiota de ambas as espécies mas não de maneira idêntica. Isso pode explicar as diferenças no pH fecal tanto em WKY como em SHR.

Com relação a produção de AGCC, diversos estudos comprovaram que a inclusão de inulina e FOS na dieta promovem um aumento na produção destes metabólitos pela população bacteriana intestinal (Abbeele P, 2011). As figuras 2 B-D indicam em certos pontos uma tendência ao aumento na quantidade fecal de

butirato, acetato e propionato em ambas as espécies submetidas a dieta FOS-AIN-93M.

As análises séricas de glicose, corpos cetônicos e butirato não indicaram alterações nos animais em dieta rica em fibras. Baseado na análise de estudos prévios, o consumo de frutanos como a inulina não exerce influência sobre a glicemia (Bonsu NKA, 2011). E os AGCC produzidos pelas bactérias acabam sendo em grande parte utilizados pelas células do intestino como fonte energética para as células intestinais, além de promover proliferação de colonócitos e melhorar o sistema de auto defesa do organismo (Guilloteau P, 2010).

A pressão arterial dos animais foi aferida duas vezes por semana pelo método caudal não invasivo. A partir da sexta semana em dieta, houve uma diferenciação na PA dos ratos SHR em dieta FOS-AIN-93M. A PA aumentou significativamente neste grupo, mas não sofreu alterações no grupo WKY submetidos a mesma dieta (Figura 3).

Como esse método de aferição de PA pode ser considerado estressante para os animais, resolvemos realizar um teste comportamental para verificarmos os níveis de ansiedade dos animais, e se a dieta causou o aumento da PA devido a fatores comportamentais, ao invés de apenas fisiológicos. Os animais foram submetidos ao teste do Labirinto Elevado e não apresentaram nenhuma alteração devido a dieta (Figura 4A-E). No entanto, os grupos SHR mostraram níveis mais elevados de ansiedade do que os WKY, pois os animais se movimentaram menos (Figura 4A-C) e ficaram mais tempo reclusos nos braços fechados do labirinto do que em braço aberto (Figura 4D e E). Sendo assim, a dieta não causou ansiedade nos animais, portanto a alteração da PA não pode ser atribuída a este fator.

O sistema imunológico também está intrinsecamente relacionado a saúde do intestino, sendo que este é considerado um órgão do sistema imune (Geuking MB, 2014). Há mais de 50 anos, sabe-se que as células do sistema imunológico contribuem para o desenvolvimento da hipertensão. Nos últimos anos, demonstrou-se a importância das células T no desenvolvimento da hipertensão (Trott DW e Harrison DG, 2014). Baseados nestes estudos que relacionam hipertensão e sistema imune, algumas citocinas inflamatórias foram analisadas por citometria de fluxo (Figuras 5A-G) e posteriormente por RT-PCR (Figura 11C e D). A citometria de fluxo não mostrou alterações significativas devido a dieta FOS-AIN-93M, porém, em análise do intestino proximal por PCR pudemos observar uma redução nos níveis de TNF α em ratos SHR submetidos a dieta rica em fibras.

Após 10 semanas em tratamento com a dieta, os animais foram submetidos a uma cirurgia para a implantação dos sensores de radiotelemetria. As análises de 24h indicam um aumento na PA sistólica, diastólica e média em alguns horários do dia e da noite (Figuras 6 A,C e E). A média das 24h mostrou que os animais SHR em dieta FOS-AIN-93M tem um aumento significativo na PA, mas não na frequência cardíaca (Figura 6G). Os animais WKY em dieta FOS-AIN-93M não apresentaram alterações em nenhum ponto do dia em relação aos animais em dieta controle AIN-93M.

Curiosamente, a temperatura dos animais SHR em dieta rica em fibras foi em média menor do que os demais grupos (Figura 6I). Não existem muitos estudos que avaliam o controle da temperatura corporal pelas bactérias intestinais, mas os pesquisadores Tan e Knight (2018) discutem em sua revisão os mecanismos pelos quais o sistema nervoso regula a temperatura visceral e periférica do hospedeiro. As mudanças de temperatura corporal são detectadas por termorreceptores

especializados localizados em diversas áreas do organismo, incluindo as vísceras, cérebro e medula espinhal. Dadas as alterações autonômicas encontradas nos animais SHR e intensificadas pela dieta rica em fibras, uma das teorias para a redução da temperatura corporal é a hiperativação de determinados neuromoduladores periféricos e centrais, tais como TRPM2, Glut2, LepR e BDNF. Esses neuromoduladores atuam na diminuição da temperatura e podem estar superexpressos no SNC dos animais SHR expostos a dieta rica em fibras. Essa hipótese precisa ser investigada, pois pode ajudar a entender outros aspectos da disfunção autonômica desses animais.

A análise espectral é uma ferramenta interessante para se avaliar a atividade simpática e parassimpática dos ratos hipertensos e normotensos. Assim como foi amplamente descrito anteriormente (Yang e Zubcevic, 2017; Winklewski PJ, 2015), nosso estudo também mostrou que a razão entre atividade simpática / atividade parassimpática (LF/HF) também é aumentada em ratos SHR em relação aos normotensos WKY (Figura 7A-D).

Para avaliarmos a resposta dos animais ao estresse, decidimos realizar um teste comportamental no equipamento de radiotelemetria. O teste de estresse por contenção é um modelo experimental para estudar respostas cardiovasculares ao estresse. Os animais permaneceram imóveis em um contensor e são colocados dentro de sua própria caixa pelo período de 20 minutos nos quais os dados foram coletados minuto a minuto. Como esperado, o estresse aumentou a PA de todos os animais devido a sua exposição ao estresse. Porém, houve um aumento ainda maior na PA sistólica, diastólica e média (Figura 8A-C) dos ratos SHR em dieta rica em fibras, quando comparado aos SHR em ração padrão. Os animais normotensos WKY tratados com dieta FOS-AIN-93M apresentam uma tendência ao aumento da

PA e da frequência cardíaca (Figura 8A-D), mas essa alteração não é tão significativa quanto a encontrada nos SHR em dieta rica em fibras.

Estudos indicam que as respostas ao estresse agudo promovem aumento da razão LF/HF, conseqüentemente elevando a PA. O aumento exacerbado da PA em animais alimentados com dieta rica em fibras pode ser influenciado pelo aumento de AGCC nos intestinos. Os AGCC são também moléculas sinalizadoras que se ligam a receptores acoplados à proteína G (GPRs) conhecidos como GPR41 (FFAR3) e GPR43 (FFAR2). Estudos indicam que a ativação de FFAR3 aumenta a ativação e a liberação de norepinefrina pelos neurônios simpáticos (Soto E JL, 2014). Porém, em nosso estudo, a expressão de FFAR2 e 3 no cólon proximal não foi alterada devido a dieta. Outras análises são necessárias para que haja um melhor entendimento das vias moleculares de ativação do SNS pelos AGCC. Além disso, outros tecidos necessitam ser avaliados, como gânglios nodosos, nervo vago, regiões cardio reguladoras do cérebro, entre outros.

Ao completar dez semanas em tratamento com a dieta FOS-AIN-93M, os ratos SHR foram submetidos a uma ressonância magnética aumentada com magnésio e os resultados comprovam o que foi observado na análise espectral. Foram escaneadas 41 regiões do cérebro, das quais apenas 5 mostraram alterações em relação ao grupo controle alimentado com dieta padrão AIN-93M. As regiões CA2, área cinzenta central, núcleo paraventricular, tálamo cinzento periaqueductal e núcleo do trato solitário mostraram-se hiperativas em animais alimentados com dieta FOS-AIN-93M (Figura 10B-F). Essas regiões foram descritas como cardio reguladoras. O aumento da atividade neuronal e na excitabilidade (ou seja, plasticidade sináptica) no núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo medeia a elevada atividade simpática em vários modelos de hipertensão (Parati G, 2014).

O SHR é um modelo de hipertensão neurogênica em que estudos eletrofisiológicos realizados em porções cerebrais revelaram que há aumento da atividade de neurônios pré sinápticos no PVN que se projetam para a espinha dorsal, bem como neurônios pré autonômicos que inervam o NTS. O tônus neuronal pré simpático é regulado pela entrada de γ -aminobutyric acid (GABA) com função excitatória ou inibitória (Carmichael CY e Wainford RD, 2015). Nos animais SHR, ocorre uma disfunção no sistema GABAérgico inibitório no PVN, e como consequência o tônus simpático é elevado nestes animais. A mesma alteração foi encontrada em outro modelo animal de hipertensão neurogênica, o camundongo Schlager (Davern PJ, 2014).

São necessários muitos estudos para que o eixo intestino-cérebro seja completamente compreendido na hipertensão arterial. Os próximos passos desta pesquisa terão como foco o sistema nervoso central e periférico na modulação da PA. Existem evidências, em estudos com animais, de que a microbiota intestinal pode ativar o nervo vago e que tal ativação desempenha um papel crítico na mediação dos efeitos sobre o cérebro e o comportamento (Bonaz B, 2018). Compreender a indução e transmissão de sinais no nervo vago e em outros nervos periféricos presentes no intestino pode ter implicações importantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas baseadas na microbiota e/ou nutrição para a hipertensão arterial.

Conclusão

A microbiota intestinal desempenha um papel importante na comunicação cérebro-intestino na hipertensão. Este fato pode apresentar um novo alvo terapêutico para o tratamento da hipertensão.

Referências

Abbeele, Pieter Van Den, Philippe GÃ©rard, Sylvie Rabot, AurÃ©lia Bruneau, Sahar El Aidy, Muriel Derrien, Michiel Kleerebezem, Erwin G. Zoetendal, Hauke Smidt, Willy Verstraete, Tom Van De Wiele, and Sam Possemiers. "Arabinoxylans and Inulin Differentially Modulate the Mucosal and Luminal Gut Microbiota and Mucin-degradation in Humanized Rats." *Environmental Microbiology* 13.10 (2011): 2667-680. Web.

Bonaz, Bruno, Thomas Bazin, and Sonia Pellissier. "The Vagus Nerve at the Interface of the Microbiota-Gut-Brain Axis." *Frontiers in Neuroscience* 12 (2018): n. pag. Web.

Bonsu, Nana K.a., C. Shanthi Johnson, and Katherine M. Mcleod. "Can Dietary Fructans Lower Serum Glucose?" *Journal of Diabetes* 3.1 (2011): 58-66. Web.

BRASIL. MinistÃ©rio da SaÃºde. Guia alimentar para a populaÃ§Ã£o brasileira. 2. ed. BrasÃ­lia: MinistÃ©rio da SaÃºde, 2014.

Bromfield S, Muntner P. High blood pressure: The leading global burden of disease risk factor and the need for worldwide prevention programs. *Curr Hypertens Rep.* 2013;15:134–6

Bruggencate, Sandra J. M. Ten, et al. "Dietary Fructooligosaccharides Increase Intestinal Permeability in Rats." *The Journal of Nutrition*, vol. 135, no. 4, 2005, pp. 837–842., doi:10.1093/jn/135.4.837.

Campbell, Norm R.c., and Mark L. Niebylski. "Prevention and Control of Hypertension." *Current Opinion in Cardiology*, vol. 29, no. 4, 2014, pp. 324–330., doi:10.1097/hco.000000000000067.

Carmichael, Casey Y., and Richard D. Wainford. "Hypothalamic Signaling Mechanisms in Hypertension." *Current Hypertension Reports* 17.5 (2015): n. pag. Web.

Ceroni, Alexandre, et al. "Chronic Absence of Baroreceptor Inputs Prevents Training-Induced Cardiovascular Adjustments in Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats." *Experimental Physiology*, vol. 94, no. 6, 2009, pp. 630–640., doi:10.1113/expphysiol.2008.046128.

Davern PJ, Chowdhury S, Jackson KL, Nguyen-Huu TP, Head GA. GABAA receptor dysfunction contributes to high blood pressure and exaggerated response to stress in Schlager genetically hypertensive mice. *J Hypertens*. 2014;32(2):352–62.

De Baere, S., Eeckhaut, V., Steppe, M., De Maesschalck, C., De Backer, P., Van Immerseel, F., et al. (2013). Development of a HPLC-UV method for the quantitative determination of four short-chain fatty acids and lactic acid produced by intestinal bacteria during in vitro fermentation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 80, 107–115.

Doyle, Lorna, and Kevin D. Cashman. "The Effect of Nutrient Profiles of the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) Diets on Blood Pressure and Bone Metabolism and Composition in Normotensive and Hypertensive Rats." *British Journal of Nutrition* 89.05 (2003): 713.

Eckberg, D. L. (1997). Sympathovagal Balance : A Critical Appraisal. *Circulation*, 96(9), 3224-3232

Ettehad, Dena, et al. "Blood Pressure Lowering for Prevention of Cardiovascular Disease and Death: a Systematic Review and Meta-Analysis." *The Lancet*, vol. 387, no. 10022, 2016, pp. 957–967., doi:10.1016/s0140-6736(15)01225-8.

Filippo, C. De, et al. "Impact of Diet in Shaping Gut Microbiota Revealed by a Comparative Study in Children from Europe and Rural Africa." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 33, 2010, pp. 14691–14696., doi:10.1073/pnas.1005963107.

Geuking, Markus B., Yasmin KÄ¶lller, Sandra Rupp, and Kathy D. McCoy. "The Interplay between the Gut Microbiota and the Immune System." *Gut Microbes* 5.3 (2014): 411-18. Web.

Gibson, Glenn R., et al. "Selective Stimulation of Bifidobacteria in the Human Colon by Oligofructose and Inulin." *Gastroenterology*, vol. 108, no. 4, 1995, pp. 975–982., doi:10.1016/0016-5085(95)90192-2.

Gorman, Mary Anne, and Carol Bowman. "Position of The American Dietetic Association: Health Implications of Dietary Fiber." *Journal of the American Dietetic Association* 93.12 (1993): 1446-447.

Grassi, Guido, and Venkata S. Ram. "Evidence for a Critical Role of the Sympathetic Nervous System in Hypertension." *Journal of the American Society of Hypertension*, vol. 10, no. 5, 2016, pp. 457–466., doi:10.1016/j.jash.2016.02.015.

Guilloteau, P., L. Martin, V. Eeckhaut, R. Ducatelle, R. Zabielski, and F. Van Immerseel. "From the Gut to the Peripheral Tissues: The Multiple Effects of Butyrate." *Nutrition Research Reviews* 23.02 (2010): 366-84. Web.

Hamaker, Bruce R., and Yunus E. Tuncil. "A Perspective on the Complexity of Dietary Fiber Structures and Their Potential Effect on the Gut Microbiota." *Journal of Molecular Biology*, vol. 426, no. 23, 2014, pp. 3838–3850., doi:10.1016/j.jmb.2014.07.028.

Hart, Emma C. "Human Hypertension, Sympathetic Activity and the Selfish Brain." *Experimental Physiology*, vol. 101, no. 12, 2016, pp. 1451–1462., doi:10.1113/ep085775.

Japundzic, N., Grichois, M., Zitoun, P., Laude, D., & Elghozi, J. (1990). Spectral analysis of blood pressure and heart rate in conscious rats: Effects of autonomic blockers. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 30(2), 91-100.

Jenkins, David J. A., Cyril W. C. Kendall, and Vladimir Vuksan. "Inulin, Oligofructose and Intestinal Function." *The Journal of Nutrition* 129.7 (1999): n. pag. Web.

Jose, Pedro A., and Dominic Raj. "Gut Microbiota in Hypertension." *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, vol. 24, no. 5, 2015, pp. 403–409., doi:10.1097/mnh.000000000000149.

Jung, Tae-Hwan, et al. "In Vitro Effects of Dietary Inulin on Human Fecal Microbiota and Butyrate Production." *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 25, no. 9, 2015, pp. 1555–1558., doi:10.4014/jmb.1505.05078.

Koleva, Petya T., et al. "Inulin and Fructo-Oligosaccharides Have Divergent Effects on Colitis and Commensal Microbiota in HLA-B27 Transgenic Rats." *British Journal of Nutrition*, vol. 108, no. 09, 2012, pp. 1633–1643., doi:10.1017/s0007114511007203.

Laude, Dominique, et al. "Comparison of Various Techniques Used to Estimate Spontaneous Baroreflex Sensitivity (the EuroBaVar Study)." *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 286, no. 1, 2004, doi:10.1152/ajpregu.00709.2002.

Li, Shaoting, Lijuan Gao, Long Chen, Shiyi Ou, Wang Y, and Xichun Peng. "Continuously Ingesting Fructooligosaccharide Can't Maintain Rats' Gut Bifidobacterium at a High Level." *Journal of Food Science* 80.11 (2015): n. pag. Web.

Martelli, Davide, et al. "The Low Frequency Power of Heart Rate Variability Is Neither a Measure of Cardiac Sympathetic Tone nor of Baroreflex Sensitivity." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 307, no. 7, 2014, doi:10.1152/ajpheart.00361.2014.

Nøhr, M.k., K.I. Egerod, S.h. Christiansen, A. Gille, S. Offermanns, T.w. Schwartz, and M. Møller. "Expression of the Short Chain Fatty Acid Receptor GPR41/FFAR3 in Autonomic and Somatic Sensory Ganglia." *Neuroscience* 290 (2015): 126-37. Web.

Parati G, Esler M. The human sympathetic nervous system: its relevance in hypertension and heart failure. *Eur Heart J.* 2012;33(9):1058–66. doi: 10.1093/eurheartj/ehs041.

Perez, P. D., Hall, G., Zubcevic, J., & Febo, M. (2017). Cocaine differentially affects synaptic activity in memory and midbrain areas of female and male rats: an in vivo MEMRI study. *Brain Imaging and Behavior*

Petry, Nicolai, Ines Egli, Christophe Chassard, Christophe Lacroix, and Richard Hurrell. "Inulin Modifies the Bifidobacteria Population, Fecal Lactate Concentration, and Fecal PH but Does Not Influence Iron Absorption in Women with Low Iron Status." *The American Journal of Clinical Nutrition* 96.2 (2012): 325-31.

Pickering GW. The natural history of hypertension. *Br Med Bull.* 1952;8:305–9.

Ramirez-Farias, Carlett, Kathleen Slezak, Zoë Fuller, Alan Duncan, Grietje Holtrop, and Petra Louis. "Effect of Inulin on the Human Gut Microbiota: Stimulation of *Bifidobacterium Adolescentis* and *Faecalibacterium Prausnitzii*." *British Journal of Nutrition* 101.04 (2008): 533. Web.

Rasoamanana, Rojo, Patrick C. Even, Nicolas Darcel, Daniel Tomé, and Gilles Fromentin. "Dietary Fibers Reduce Food Intake by Satiation without Conditioned Taste Aversion in Mice." *Physiology & Behavior* 110-111 (2013): 13-19. Web.

Rossi, M., et al. "Fermentation of Fructooligosaccharides and Inulin by Bifidobacteria: a Comparative Study of Pure and Fecal Cultures." *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 10, 2005, pp. 6150–6158., doi:10.1128/aem.71.10.6150-6158.2005.

Schepens, Marloes A. A., et al. "Dietary Calcium Decreases but Short-Chain Fructo-Oligosaccharides Increase Colonic Permeability in Rats." *British Journal of Nutrition*, vol. 104, no. 12, 2010, pp. 1780–1786., doi:10.1017/s0007114510002990.

Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.*2010;90:859–904. doi: 10.1152/physrev.00045.2009.

Seravalle, G., Mancia, G. & Grassi, G. High Blood Press Cardiovasc Prev (2014) 21: 89. <https://doi.org/10.1007/s40292-014-0056-1>

Shamshirgaran, Seyedmorteza, et al. "Hypertension Prevalence, Awareness, Treatment and Its Correlates among People 35 Years and Older: Result from Pilot Phase of the Azar Cohort Study." *Journal of Education and Health Promotion*, vol. 7, no. 1, 2018, p. 45., doi:10.4103/jehp.jehp_118_17.

Silva, Alexandre A. Da, et al. "Role of Leptin and Central Nervous System Melanocortins in Obesity Hypertension." *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, vol. 22, no. 2, 2013, pp. 135–140., doi:10.1097/mnh.0b013e32835d0c05.

Soto, Eduardo Javier López, Luisina Ongaro Gambino, and Emilio Román Mustafá. "Free Fatty Acid Receptor 3 Is a Key Target of Short Chain Fatty Acid." *Channels* 8.3 (2014): 169-71. Web.

Tan CL, Knight ZA. "Regulation of Body Temperature by the Nervous System." *Neuron*. 2018 Apr 4;98(1):31-48. doi: 10.1016/j.neuron.2018.02.022.

Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*.2012;489:242–249. doi: 10.1038/nature11552

Valcheva, Rosica, et al. "117 Prebiotics Maintain Biodiversity of the Intestinal Microbiota and Reduce Colitis in HLA-B27 Transgenic Rats." *Gastroenterology*, vol. 136, no. 5, 2009, doi:10.1016/s0016-5085(09)60100-1.

Wallin, B. G., et al. "Comparison of Sympathetic Nerve Activity in Normotensive and Hypertensive Subjects." *Circulation Research*, vol. 33, no. 1, 1973, pp. 9–21., doi:10.1161/01.res.33.1.9.

Winklewski, Pawel J., Marek Radkowski, and Urszula Demkow. "Relevance of Immune-Sympathetic Nervous System Interplay for the Development of Hypertension." *Advances in Experimental Medicine and Biology Pathophysiology of Respiration* (2015): 37-43. Web.

World Health Organization. *A Global Brief on Hypertension: Silent Killer, Global Public Health Crisis*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2013

Yang, Tao, and Jasenka Zubcevic. "Gut–Brain Axis in Regulation of Blood Pressure." *Frontiers in Physiology* 8 (2017): n. pag. Web.

Yang, Tao, Monica M. Santisteban, Vermali Rodriguez, Eric Li, Niousha Ahmari, Jessica Marulanda Carvajal, Mojgan Zadeh, Minghao Gong, Yanfei Qi, Jasenka Zubcevic, Bikash Sahay, Carl J. Pepine, Mohan K. Raizada, and Mansour

Mohamadzadeh. "Gut Dysbiosis Is Linked to Hypertension Novelty and Significance." *Hypertension* 65.6 (2015): 1331-340. Web.

Zhang C1, Zhang M, Wang S, Han R, Cao Y, Hua W, Mao Y, Zhang X, Pang X, Wei C, Zhao G, Chen Y, Zhao L. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *The ISME Journal* 2010 Feb;4(2):232-41.

Zhao, Ying, Junfang Wu, Jia V. Li, Ning-Yi Zhou, Huiru Tang, and Yulan Wang. "Gut Microbiota Composition Modifies Fecal Metabolic Profiles in Mice." *Journal of Proteome Research* 12.6 (2013): 2987-999.

Zubcevic J , Jun JY , Kim S , Perez PD , Afzal A , Shan Z , Li W , Santisteban MM , Yuan W , Febo M , Mocco J , Feng Y , Scott E , Baekey DM , Raizada MK .Altered inflammatory response is associated with an impaired autonomic input to the bone marrow in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 63: 542-550, 2014.

Anexos

1. Apresentação de pôster em AHA Joint Scientific Sessions 2017

Detalhes da apresentação

Congresso: AHA Joint Scientific Sessions 2017

Data: 16/setembro/2017

Local: San Francisco - Califórnia - EUA

Resumo

Soluble fiber diet alters cardiovascular responses to stress in normotensive WKY rats

Carla G. B. Silva, Tao Yang, Wendi L. Malphurs, Kacy L. Magee, Thomas W. Vickroy, Jasenka Zubcevic

Department of Physiological Sciences, College of Veterinary Medicine,
University of Florida, Gainesville, FL32610

Gut microbiota is crucial for function of the gastrointestinal (GI) tract, and modulates the communication between the GI tract and the central nervous system. Microbial metabolites such as propionate have been shown to regulate blood pressure (BP), while butyrate, one of the major bacterial fermented byproducts, reportedly produces beneficial effects in multiple dysbiosis-related diseases. We previously showed that chronic supplementation with soluble fiber-rich, butyrolitic diet modified microbiota and increased BP in the spontaneously hypertensive rat (SHR). Here, we tested the impact of same diet on BP regulation in the Wistar Kyoto rats (WKY).

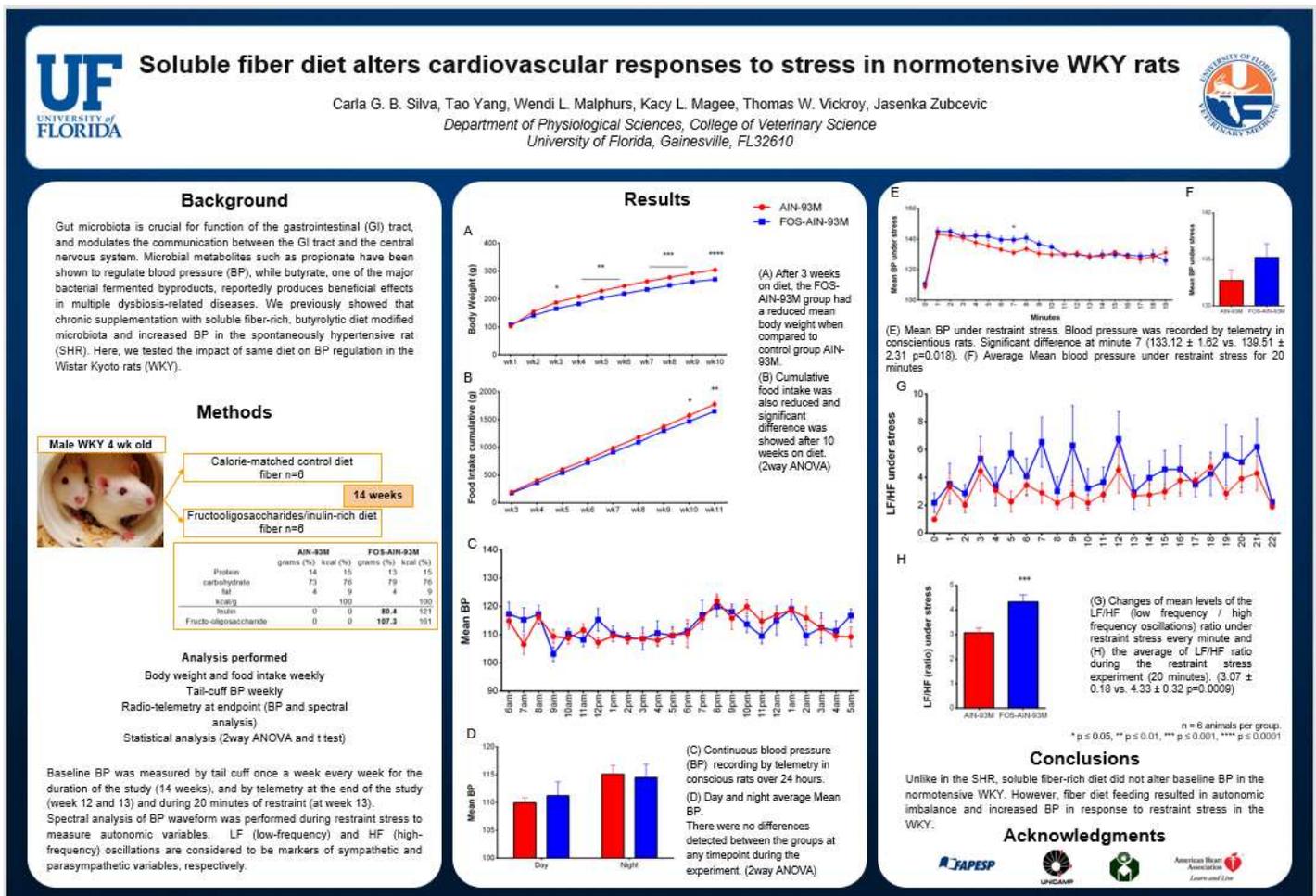
Methods: Male 4 weeks old WKY were placed on either the fructooligosaccharides/inulin-rich diet (fiber, N=6), or its calorie-matched control diet (control, N=6) (Research Diets, Inc.) for 14 weeks. Baseline BP was measured by tail cuff every week for the duration of the study, and by telemetry at the end of the

study and during 20 minutes of restraint stress. Spectral analysis of BP waveform was performed during restraint stress to measure autonomic variables.

Results: We observed no significant difference in mean BP measured by tailcuff or by telemetry between the two groups. However, there was a small but significant increase in mean BP after 2 minutes of restraint (104.5 ± 7.45 mmHg vs. 116.3 ± 3.19 mmHg; $p=0.0411$, $n=6$), which was associated with a trend in increase in LF/HF variable linked with vasovagal balance (1.99 ± 1.43 vs. 3.04 ± 1.46 , $p=0.09$) in the fiber group when submitted to restraint stress.

Conclusion: Unlike in the SHR, fiber-rich diet did not alter baseline BP in the normotensive WKY. However, chronic fiber diet produced autonomic imbalance and increased BP in response to restraint stress in the WKY.

Poster apresentado em AHA Joint Scientific Sessions 2017



2. Apresentação de pôster em Experimental Biology 2018

Detalhes da apresentação:

Congresso: Experimental Biology 2018

Data: 21 a 25 de abril de 2018

Local: San Diego - California - EUA

Resumo

Inulin/FOS-rich diet alters gut microbiota, brain activity and cardiovascular responses
in the SHR

Carla G. B. Silva, Tao Yang, Wendi L. Malphurs, Kacy L. Magee, Riley M Larkin,
Luis Colon-Perez, Marcelo Febo, Thomas W. Vickroy, Jasenka Zubcevic
Department of Physiological Sciences, College of Veterinary Medicine,
University of Florida, Gainesville, FL32610

It is well established that hypertension is associated with autonomic dysfunction and gut dysbiosis. Here, we show that chronic inulin/FOS-rich diet alters gut microbiota, promotes autonomic dysfunction, and increases blood pressure (BP) in conscious unrestrained spontaneously hypertensive rat (SHR), as well as the SHR submitted to restraint stress. These alterations were accompanied by activation of cardioregulatory brain regions, namely the paraventricular nucleus (PVN) of hypothalamus and solitary tract nucleus (NTS), as measured by manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). BP was also significantly increased in the inulin/FOS diet-fed Wistar-Kyoto (WKY) rat submitted to restraint stress, albeit to a lesser extent.

Methods: Male 4 weeks old WKY and SHR were fed with either the inulin/fructooligosaccharides (FOS)-rich diet (fiber, n=6), or its calorie-matched control diet (ctl, n=6) (Research Diets, Inc.) for 14 weeks. BP was measured weekly by tail cuff and telemetry, and during 20 minutes of restraint stress. Spectral analysis of BP waveform signal was performed to derive autonomic variables. MEMRI was performed in SHR at tenth week on diet.

Results: Inulin/FOS-rich diet caused significant shifts in gut bacterial profiles in WKY and SHR (e.g. *Bifidobacterium* population increased in diet-fed WKY:

0.006624 ± 0.0018 vs. 0.4989 ± 0.1745 , $n=6$; $p=0.0073$, $n=6$, and diet-fed SHR: 0.03099 ± 0.0127 vs. 0.2134 ± 0.0656 ; $p=0.0258$, $n=6$). We observed no change in BP in conscious unrestrained WKY; however, conscious unrestrained SHR fed with inulin/FOS diet had significantly higher BP compared to control (163.8 ± 1.6 vs. 169.6 ± 1.3 ; $p=0.0083$, $n=6$). Restraint stress produced a small but significant increase in BP in inulin/FOS-fed WKY compared to control (104.5 ± 7.45 mmHg vs. 116.3 ± 3.19 mmHg; $p=0.0411$, $n=6$). This effect was more pronounced in the SHR on inulin/FOS compared to control diet (189.6 ± 2.1 vs. 198.9 ± 1.9 ; $p=0.0024$, $n=6$). These responses were associated with a trend in increase in LF/HF (vasovagal) balance in the diet-fed WKY (1.99 ± 1.43 vs. 3.04 ± 1.46 ; $p=0.09$, $n=6$), and a significant increase in LF/HF in the diet-fed SHR (6.49 ± 0.47 vs. 8.16 ± 0.59 , $p=0.0306$, $n=6$). MEMRI showed increased activation of the PVN (-0.6514 ± 0.07 vs. 0.05026 ± 0.06 ; $p=0.0018$, $n=3$) and NTS (0.1194 ± 0.05 vs. 0.3817 ± 0.09 ; $p=0.0409$, $n=3$) in diet-fed SHR.

Conclusion: Gut microbiota plays an important role in brain-gut communication in hypertension. This presents a novel therapeutic target for treatment of hypertension.

Poster apresentado em Experimental Biology 2018



Inulin/FOS-rich diet alters gut microbiota, brain activity and cardiovascular responses in the SHR

Carla G. B. Silva, Tao Yang, Wendi L. Malphurs, Kacy L. Magee, Riley M Larkin, Luis Colon-Perez, Marcelo Febo, Thomas W. Vickroy, Jasenka Zubcevic
Department of Physiological Sciences, College of Veterinary Medicine,
University of Florida, Gainesville, FL32610



Background

Hypertension is associated with autonomic dysfunction and gut dysbiosis. Here, we show that chronic FOS / inulin (fiber) - rich diet alters gut microbiota, promotes autonomic dysfunction, and increases BP in conscious unrestrained SHR, as well as the SHR submitted to restraint stress. These alterations were accompanied by activation of cardioregulatory brain regions, namely the PVN and the NTS, as measured by manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). BP was also significantly increased in the high-fiber diet fed WKY rat submitted to restraint stress, albeit to a lesser extent.

Methods

♂ WKY and SHR 4wk



Calorie-matched control diet
n=6
14 weeks
Fiber (inulin/FOS) - rich diet
n=6

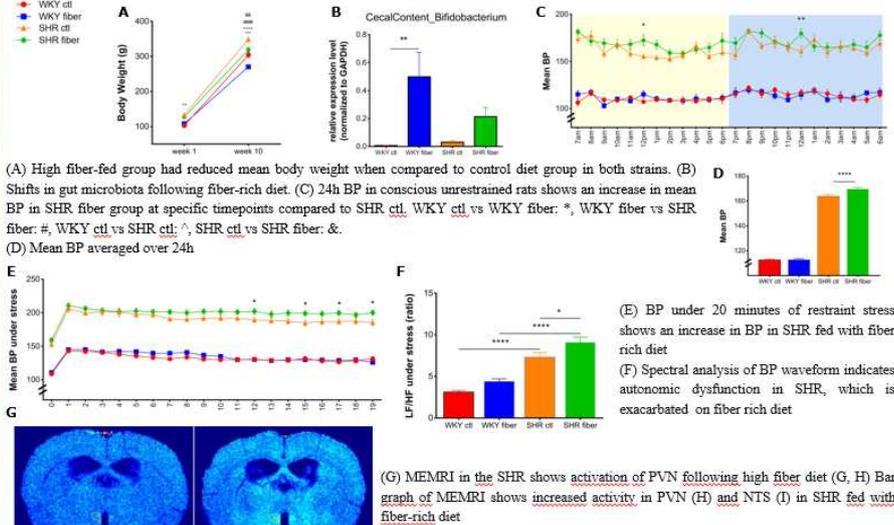
	AIN-93M		FOS-AIN-93M	
	grams (%)	kcal (%)	grams (%)	kcal (%)
Protein	14	15	13	15
carbohydrate	73	76	79	76
fat	4	9	4	9
kcal/g		100		100
Inulin	0	0	80.4	121
Fructo-oligosaccharide	0	0	107.3	161

BP was measured weekly by tail cuff and telemetry, and during 20 minutes of restraint stress. Spectral analysis of BP waveform signal was performed to derive autonomic variables. MEMRI was performed in SHR at tenth week on diet.

Analysis performed

Body weight and tail cuff weekly
BP analysis by telemetry (24h)
20 minutes restraint stress telemetry BP and spectral analysis
Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI)
Statistical analysis (2way ANOVA and t test)

Results



Conclusion

Gut microbiota plays an important role in brain-gut communication in hypertension. This presents a novel therapeutic target for treatment of hypertension.

Acknowledgments



n = 6 animals per group.
* p < 0.05
** p < 0.01
*** p < 0.001
**** p < 0.0001