

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARIA EDUARDA TENÓRIO OLIVEIRA

Análise multi-ômica da microbiota intestinal de ratos com epilepsia do lobo temporal
induzida por lítio-pilocarpina

Maceió

2022

MARIA EDUARDA TENÓRIO OLIVEIRA

Análise multi-ômica da microbiota intestinal de ratos com epilepsia do lobo temporal
induzida por lítio-pilocarpina

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências da
Saúde da Universidade Federal de Alagoas
como requisito parcial para obtenção do
título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitaí

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Melissa Fontes
Landell

Maceió

2022

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 - 1767

- O48a Oliveira, Maria Eduarda Tenório.
Análise multi-ômica da microbiota intestinal de ratos com epilepsia do lobo temporal induzida por lítio-pilocarpina / Maria Eduarda Tenório Oliveira. – 2022.
72 f. : il.
- Orientador: Daniel Leite Góes Gitaí.
Coorientadora: Melissa Fontes Landell.
Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2022.
- Bibliografia: f. 57-70.
Anexos: f. 71-72.
1. Eixo intestino-cérebro. 2. Microbiota. 3. Metabólitos. 4. Epileptogênese. I.
Título.

CDU: 616.34:616.831

Aos meus pais, Janaina Tenório Rocha e Silvanio Oliveira Silva

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, força que guia todas as coisas;

Aos meus pais, Janaina Tenório Rocha Oliveira e Silvanio Oliveira Silva, meus maiores incentivadores, por todos os conselhos e confiança, agradeço todo apoio que me foi dado nos momentos difíceis que enfrentamos, e por sempre estarem comigo;

Ao meu irmão Gustavo Frentzen Tenório Oliveira, pelo apoio;

A minha sobrinha Sofia Muniz Tenório Oliveira, por todo amor;

Aos meus familiares, avós, tios e primos, pelo carinho e apoio, em especial aos meus avós Domingos Gonçalo Rocha e Irene Tenório Gonçalo Rocha;

A minha avó Maria Nazaré Siqueira Silva (em memória);

Ao meu orientador, Dr. Daniel Leite Góes Gitaí, por todos os ensinamentos e paciência;

A Dra. Melissa Fontes Landell, por todas as orientações;

Aos meus colegas do laboratório de biologia celular e molecular, Maria Jordana, Pedro Paulino, Gabriele Santos, Carmem Arroxelas, Wanessa Pereira, Delma Holanda e em especial ao Erivaldo Júnior, meu companheiro em todas as etapas;

Ao Gustavo Paulino, por todas as colaborações;

A equipe da Central de Genômica e Bioinformática da Universidade Federal do Ceará, Brasil, pela colaboração;

Ao professor Tiago Aquino e ao Jeferson Ursulino pelas colaborações nas análises metabolômicas;

Aos professores membros das bancas de qualificação e defesa;

Aos meus amigos, Juliana Silva, Rafael Alves, Rafael Almeida, Cleandre Barbosa, Lorena Silva, Mirella Almeida, Bruno Barbosa, Johnatan Ferreira por sempre me incentivarem;

A todos que participaram direta ou indiretamente desta etapa da minha vida, o meu muito obrigada!

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser conhecida.”

Carl Sagan

RESUMO

O trato gastrointestinal (TGI) humano é colonizado por trilhões de micro-organismos que se comunicam com o sistema nervoso central a partir da transmissão bidirecional de sinais através do eixo microbiota-intestino-cérebro. Os produtos secretados pela microbiota intestinal estimulam o sistema nervoso central, e, por conseguinte, sua desregulação, podendo estar associada a diferentes doenças neurológicas, incluindo a epilepsia. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar alterações na composição da microbiota intestinal e do seu metaboloma em ratos submetidos à epilepsia do lobo temporal, a partir de uma abordagem multi-ômica. Para isto, 6 ratos machos *Wistar* foram submetidos ao *Status Epilepticus* (SE) induzido por lítio-pilocarpina e monitorados durante 60 dias. Cada animal teve o material fecal coletado antes da indução do SE (grupo pré-ELT) e após a emergência das crises espontâneas (grupo pós-ELT). Ratos Naïve (n = 6) foram utilizados como controle para os mesmos pontos de coletas (Naïve t1 e Naïve t2). O sequenciamento do gene 16S rRNA acoplado à análise de bioinformática revelou uma mudança taxonômica e composicional, em ratos epiléticos. No grupo pós-ELT, a riqueza das espécies (índice Chao1) foi significativamente menor, e a análise da diversidade beta revelou aglomerações separadas das de pré-ELT. A análise da abundância taxonômica revelou um aumento significativo do filo Desulfobacterota e uma diminuição de Patescibacteria. Em nível de gênero, a análise DESeq2 e LEfSe resultou em 18 gêneros significativamente enriquecidos entre os grupos pós-ELT e pré-ELT. A análise de ressonância magnética nuclear identificou 9 classes de metabólitos nos grupos pré e pós-ELT. Das 9 classes identificadas, 6 se relacionaram positivamente com o estado epilético: ácido acético, ácido propiônico, ácido glutâmico, ácido butírico, alanina e glicina. A análise de correlação microbiota-metaboloma mostrou que os gêneros diferentemente abundantes em ratos pós-ELT estão associados aos metabólitos alterados, especialmente os pró-inflamatórios *Desulfovibrio* e *Marybiatria*, que foram enriquecidos em animais epiléticos e positivamente correlacionados com neurotransmissores excitatórios. Por conseguinte, os nossos dados apoiam que a disbiose bacteriana associada à epilepsia contribui para um estado convulsivo, aumentando a inflamação crônica, o desequilíbrio excitatório-inibitório, e/ou uma perturbação metabólica.

Palavras-chave: eixo intestino-cérebro, microbiota, metabólitos, epileptogênese.

ABSTRACT

The human gastrointestinal tract (TGI) is colonized by trillions of microorganisms that communicate with the central nervous system through bidirectional transmission of signals via the microbiota-intestine-brain axis. The products secreted by the gut microbiota stimulate the central nervous system, and thus its dysregulation, and may be associated with different neurological diseases, including epilepsy. Thus, the present study aimed to evaluate changes in the composition of the gut microbiota and its metabolome in rats submitted to temporal lobe epilepsy, from a multi-omic approach. For this, 6 male Wistar rats were subjected to lithium-pilocarpine-induced Status Epilepticus (SE) and monitored for 60 days. Each animal had fecal material collected before the induction of SE (pre-ELT group) and after the emergence of spontaneous seizures (post-ELT group). Naïve rats (n = 6) were used as controls for the same collection points (Naïve t1 and Naïve t2). Sequencing of the 16S rRNA gene coupled with bioinformatics analysis revealed a taxonomic and compositional change, in epileptic rats. In the post-ELT group, species richness (Chao1 index) was significantly lower, and beta diversity analysis revealed separate clusters from pre-ELT. Taxonomic abundance analysis revealed a significant increase in the phylum Desulfobacterota and a decrease in Patescibacteria. At the genus level, DESeq2 and LEfSe analysis resulted in 18 genera significantly enriched between the post-ELT and pre-ELT clusters. Nuclear magnetic resonance analysis identified 9 classes of metabolites in the pre- and post-ELT groups. Of the 9 classes identified, 6 were positively related to the epileptic state: acetic acid, propionic acid, glutamic acid, butyric acid, alanine, and glycine. microbiota-metabolome correlation analysis showed that the differentially abundant genera in post-ELT rats are associated with altered metabolites, especially the pro-inflammatory *Desulfovibrio* and *Marvybiatria*, which were enriched in epileptic animals and positively correlated with excitatory neurotransmitters. Therefore, our data support that bacterial dysbiosis associated with epilepsy contributes to a seizure state by increasing chronic inflammation, excitatory-inhibitory imbalance, and/or a metabolic disturbance.

Keywords: gut-brain axis, microbiota, metabolites, epileptogenesis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação operacional expandida da ILAE 2017 para os tipos de crises epiléticas.

Figura 2. Etapas do delineamento experimental. Etapa 1: Coleta de material fecal de animais Naïve t1 e pré-TLE; Etapa 2: Indução de *Status Epilepticus* por modelo lítio-pilocarpina; Etapa 3: Videomonitoramento para contagem de crises espontâneas; Etapa 4: Coleta de material fecal de animais Naïve t2 e pós-TLE. Etapa 5: Extração de DNA genômico com protocolo de fenol/clorofórmio; Etapa 6: Sequenciamento do gene rRNA 16S através do sequenciador Illumina MiSeq; Etapa 7: Metabolômica por ressonância magnética nuclear; Etapa 8: Análise de bioinformática e correlação.

Figura 3. Perfil taxonômico dos grupos experimental (TLE) e Naïve nível de: A) filo e B) gênero. Ao lado dos gráficos encontram-se os resultados das análises de abundância diferencial Um * indica taxas que mostraram variação significativa entre tempo 1 e tempo 2 de cada grupo experimental.

Figura 4. A e B) Chao 1 (estimador de riqueza) e índices de Shannon (diversidade) e o respectivo p-valor obtido através do teste Mann-Whitney comparando os resultados obtidos ao comparar os grupos ELT e Naïve entre t1 e t2, respectivamente. C e D) Escala Dimensional Não-Métrica (NMDS) e o respectivo valor da Análise de Similaridade (ANOSIM) dos grupos TLE e Naïve, respectivamente.

Figura 5. Gêneros bacterianos identificados por meio do método de análise discriminante do tamanho do efeito (LEFse) na microbiota intestinal dos grupos pré-TLE e pós TLE. .

Figura 6. Análise comparativa da composição taxonômica bacteriana da microbiota intestinal de ratos do grupo Naïve (A) e experimental (B). O valor “cr1” indica a mudança na composição, e valor de “W” a força estatística. Foi considerado significativo o valor de W=863.

Figura 7. Diagrama Venn mostrando o resultado das análises de microbiota core utilizando a percentagem de prevalência ideal (70%) É possível visualizar a quantidade de ASV's únicos de cada categoria e quantos são partilhados entre eles.

Figura 8. A) Análise das Coordenadas Principais (PCA) mostrando a relação entre amostras no que diz respeito aos dados obtidos através da previsão do conteúdo

metagenômico B) Vias funcionais previstas classificadas de acordo com a KEGG (Enciclopédia de Genes e Genomas de Quioto) que mostraram uma abundância diferencial significativa relacionada com o grupo TLE.

Figura 9. A) Análise de componentes principais (PCA) do perfil metabolômico dos animais pré-ELT (verde) e ELT (vermelho). B) Gráfico de carregamento dos metabólitos identificados.

Figura 10. A) Análise discriminante de mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS) do perfil metabolômico dos animais pré-ELT (verde) e ELT (vermelho). B) Gráfico de permutação.

Figura 11. Análise de enriquecimento de conjuntos de metabólitos em relação a diferentes patologias.

Figura 12. Análise de enriquecimento de conjuntos de metabólitos em relação a vias funcionais KEGG.

Figura 13. Concentração de metabólitos identificados nos animais pré-ELT (verde) e pós- ELT (vermelho).

Figura 14. Mapa de calor mostrando a correlação entre os metabólitos identificados e os gêneros bacterianos significativamente diferenciados pós-ELT.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação etiológica das epilepsias.

Tabela 2. Caracterização comportamental dos níveis de crises epiléticas em modelo animal segundo a escala de Racine (1972).

Tabela 3. Top 30 principais gêneros bacterianos de acordo com a importância medida pela média de diminuição da precisão para diferenciar ratos controles e epiléticos.

.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANCOM	Análise de composição de microbiomas
ASVs	<i>Amplicon Sequence Variants</i>
AVC	Acidente vascular cerebral
CREs	Crises recorrentes e espontâneas
DC	Dieta cetogênica
ELT	Epilepsia do lobo temporal
ELTL	Epilepsia do lobo temporal lateral
ELTM	Epilepsia do lobo temporal mesial
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HS	Esclerose hipocampal
i.p.	Injeção intraperitoneal
ILAE	International League Against Epilepsy
IPIs	Incidentes precipitantes iniciais
LEfSe	Análise Discriminante Linear de tamanho de efeito
MI	Microbiota intestinal
NMDA	N-metil-D-Aspartato
NMR	Ressonância magnética nuclear
OPLS	Análise discriminante de mínimos quadrados parciais ortogonais
PCA	Análise de componentes principais
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PTZ	Pentilenotetrazol
SE	<i>Status Epilepticus</i>
SNC	Sistema nervoso central
SNE	Sistema nervoso entérico
TGI	Trato gastrointestinal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. Aspectos gerais da epilepsia.....	18
2.2. Epilepsia do Lobo Temporal	20
2.3. Modelo experimental de epilepsia do lobo temporal mesial.....	21
2.4. A microbiota intestinal.....	22
2.5. Metaboloma intestinal.....	23
2.6. Eixo microbiota-intestino-cérebro	24
2.7. Microbiota e epilepsia.....	26
3. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo geral:	28
3.2. Objetivos específicos:	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. Animais e grupos experimentais.....	29
4.2. Indução do <i>Status Epilepticus</i> (SE)	30
4.3. Coleta de material fecal.....	31
4.4. Extração do DNA genômico total e sequenciamento do gene 16S rRNA.....	31
4.5. Processamento de dados de sequenciamento	32
4.6. Análise metabolômica por ressonância magnética nuclear (NMR).	33
5. RESULTADOS	35
5.3. Análise LEFse	36
4.3. Diversidade da microbiota intestinal	37
4.4. Análise composicional - ANCOM.....	39
4.5. Microbioma core.....	39
4.6. Predição funcional	43
4.7. Análise metabolômica.....	44
4.8. Análise de correlação bactérias x metabólitos.....	50
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXOS	73

1. INTRODUÇÃO

A epilepsia é um transtorno neurológico caracterizado por uma predisposição permanente do cérebro em gerar alterações comportamentais súbitas e recorrentes, denominadas crise epilética (SCHENKEL, 2011). Esta perturbação neurológica afeta mais de 60 milhões de pessoas em todo o mundo, aparecendo entre as condições cerebrais mais comuns (BURNEO et al., 2005; FIEST et al., 2017).

Na epilepsia do lobo temporal (ELT), a mais prevalente na população adulta, o foco epileptogênico incide em estruturas do sistema límbico, tais como o hipocampo. O estabelecimento e a manutenção da ELT dependem de insultos epileptogênicos exógenos, tais como *Status Epilepticus* (SE), convulsão febril, traumatismo craniano ou neoplasias (ENGEL, 1996; PITKÄNEN e SUTULA, 2002). O SE, por exemplo, deflagra um processo progressivo – epileptogênese – de alterações estruturais e fisiológicas no sistema nervoso central que culmina na conversão do cérebro normal em um cérebro epileptogênico (FRENCH et al., 1993; LEITE et al., 1990).

Essas alterações têm sido caracterizadas em modelos animais de SE, sendo que a maioria ocorre de forma pronunciada no hipocampo, tais como: astrogliose, morte neuronal seletiva, inflamação, estresse oxidativo, neurogênese, alterações na expressão gênica e reorganização axonal (AMBROGINI et al., 2019; BECKER, 2018; BOROWICZ-REUTT e CZUCZWAR, 2020; CHEN et al., 2019; CONBOY et al., 2021; HENSHALL, 2018; MAHFOZ e SHAHZAD, 2019; NIRWAN et al., 2018; ROMCY-PEREIRA et al., 2008; SIMONATO et al., 2021; VERHOOG et al., 2020). Entretanto, os mecanismos subjacentes a essas alterações e o seu papel tanto na epileptogênese quanto na manutenção da condição epileptogênica permanecem desconhecidos (GARCÍA-GARCÍA et al., 2011).

Recentemente, a relevância da microbiota intestinal na troca de sinais com o cérebro pelo eixo microbiota-intestino-cérebro, tem ganhado destaque. Esse eixo reúne uma complexa interação envolvendo conexões neurais, hormonais e metabólicas (ZORZO, 2020). Isto é evidenciado em alguns estudos, onde observou-se a perturbação da microbiota intestinal em alguns transtornos psiquiátricos e neurológicos, como por exemplo, perturbações do espectro do autismo (DAVOLI-FERREIRA et al., 2021; JAMES et al., 2021; MULLE et al., 2013; ZHENG et al., 2021), esclerose múltipla (CALVO-BARREIRO et al., 2018; CHU et al., 2018; ESMAEIL AMINI et al., 2020; JANGI et al., 2016), Parkinson (BAIZABAL-CARVALLO e ALONSO-JUAREZ,

2020; DODIYA et al., 2020; HUANG et al., 2021a; WANG et al., 2021), e Alzheimer (SOCHOCKA et al., 2019; SUN et al., 2020; VAN OLST et al., 2021) e depressão (BARANDOUZI et al., 2020; CHEUNG et al., 2019; KNUDSEN et al., 2021; ŁONIEWSKI et al., 2021).

Na epilepsia, os estudos - ainda que escassos - apontaram para o potencial da microbiota para regular as convulsões, como evidenciado pela modulação exógena da composição da microbiota intestinal em indivíduos epiléticos (AMLEROVA et al., 2021; ARULSAMY et al., 2020; CHATZIKONSTANTINOOU et al., 2021; IANNONE et al., 2020; ŞAFAK et al., 2020). A administração de probióticos mostrou efeitos anticonvulsivos tanto em ratos acendidos com PTZ como em pacientes humanos com epilepsia resistente a drogas (BAGHERI et al., 2019; GÓMEZ-EGUÍLAZ et al., 2018; TAHMASEBI et al., 2020; YEOM et al., 2019).

Na mesma perspectiva, os efeitos protetores da dieta cetogênica contra as convulsões foram associados a alterações na composição do microbioma intestinal (FAN et al., 2019; LINDEFELDT et al., 2019; OLSON et al., 2018; Xie et al., 2017; ZHANG et al., 2018). Recentemente, ao utilizar um modelo de tratamento de ratos, foi demonstrado que o transplante de microbiota fecal (FMT) pode mediar um aumento da susceptibilidade de convulsão induzida pelo estresse (MEDEL-MATUS et al., 2018). Além disso, a microbiota pode desempenhar um papel importante na mediação de fatores precipitantes de convulsões, tais como o uso de medicamentos, infecções, estresse físico e hormonal (LUM et al., 2020).

Além de alterações na composição bacteriana da microbiota intestinal, alterações no perfil metabólico destes micro-organismos podem influenciar no processo de epileptogênese. O papel modulatório da microbiota nas crises epiléticas foi atribuído à capacidade das bactérias de sintetizar/modificar metabolitos e neurotransmissores que visam diferentes características dos processos epiléticos, tais como a neurogênese, plasticidade sináptica, e neuroinflamação (STRANDWITZ, 2018; YARANDI et al., 2016; YUNES et al., 2016). Os metabolitos podem influenciar as respostas celulares locais e sistêmicas, e podem fornecer informações sobre os mecanismos que fundamentam o processo e progressão da doença (DONATTI et al., 2020).

Apesar das evidências, até onde pudemos encontrar, não existem estudos que avaliem a mudança na composição da microbiota a partir do processo epileptogênico induzido por pilocarpina. Desta forma, no presente estudo trazemos a hipótese de que a epileptogênese pode ser capaz de levar a alterações na composição da microbiota, e essa

questão foi abordada em modelo experimental de epilepsia. Para isso, realizamos o sequenciamento genético em larga escala e a análise do metaboloma do material fecal coletado de ratos antes e após indução de epilepsia, com o objetivo de identificar táxons bacterianos e metabólitos que podem estar associados à esta desordem.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais da epilepsia

A epilepsia é uma condição caracterizada pela predisposição persistente do cérebro gerar crises epiléticas espontâneas (YACUBIAN; KOCHEN, 2014). Uma crise epilética é definida como sinais ou sintomas decorrentes de atividade excessiva e sincrônica do cérebro, que leva a eventos motores involuntários e alterações na consciência (THURMAN et al., 2011). Epilepsia é uma doença neuronal observada mundialmente e ligada a diferentes causas. A incidência e etiologia das epilepsias são variáveis entre os países e populações, sendo mais frequente em países que estão em desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial de Saúde, epilepsia é uma das doenças neurológicas mais comuns, afetando cerca de 3 milhões de brasileiros, e em torno de 50 milhões de pessoas no mundo, com uma proporção de 4 a 10 casos para cada 1000 habitantes em países desenvolvidos, podendo dobrar em países em desenvolvimento.

Segundo a *International League Against Epilepsy - ILAE* (2017), as crises epiléticas são classificadas em: 1) crises de início focal, onde são originárias em redes limitadas a um hemisfério, podendo estar discretamente localizadas ou distribuídas de forma mais ampla e são divididas em crises perceptivas e disceptivas; 2) crises de início generalizado, onde ocorre envolvimento de ambos hemisférios cerebrais, geralmente com perda de consciência, e são divididas em motoras e não motoras; 3) crises de início desconhecido, onde o início da crise não foi presenciado. Existe ainda uma classificação especial, a “focal evoluindo para tônico-clônica bilateral”, onde apresenta-se um padrão de propagação de crise, o início acontece em um dos hemisférios, e a crise se propaga comprometendo secundariamente os dois hemisférios cerebrais. A figura 1 apresenta as classificações e subcategorias das crises epiléticas.

Figura 1. Classificação operacional expandida da ILAE 2017 para os tipos de crises epiléticas.



Quanto a etiologia, a ILAE (2017) recomenda uma classificação que engloba seis grupos: estrutural, genético, infeccioso, metabólico, imune e desconhecida.

Tabela 1. Classificação etiológica das epilepsias

Tipo de epilepsia	Causa
Estrutural	Refere-se a anormalidades estruturais no cérebro que aumentam o risco de desenvolvimento da epilepsia. Podem ser adquiridas através de acidente vascular cerebral, trauma e infecção ou malformações genéticas.
Genética	A epilepsia é resultado direto de uma mutação genética conhecida ou presumida, podendo ou não ser herdada. A etiologia genética não exclui contribuição de fatores ambientais.
Infecciosa	Surge como resultado de uma infecção. Como a neurocisticercose, tuberculose e infecções congênitas. A etiologia infecciosa se refere a epilepsia e não a crises decorrentes de uma infecção aguda.

Metabólica	A epilepsia surge como resultado direto de um distúrbio metabólico conhecido ou presumido onde o sintoma principal do distúrbio são as crises epiléticas.
Imune	Refere-se a epilepsia que surge como resultado de um distúrbio imunológico. Quando há uma inflamação imuno-mediada no sistema nervoso central.
Desconhecida	Existem muitos pacientes com epilepsia em que as causas de suas crises não são conhecidas. Deste modo não é possível fazer um diagnóstico específico além da semiologia eletroclínica básica.

Fonte: ILAE, 2017

Vale ressaltar que, as etiologias da epilepsia não são hierárquicas e a importância dada ao grupo etiológico dependerá de cada circunstância. Assim, a epilepsia de um paciente pode ser classificada em mais de um grupo etiológico.

2.2. Epilepsia do Lobo Temporal

Dentre as epilepsias estruturais, a epilepsia do lobo temporal (ELT) é o tipo mais comum, sendo responsável por aproximadamente 40% dos casos (SCHENKEL, 2011). As crises são oriundas de alterações na região do lobo temporal e cursam como crises focais simples ou complexas que se originam em estruturas do lobo temporal, e geralmente precedidas por auras (FERNANDES, 2013). Quanto à localização do foco epileptogênico e semiologia das crises, a epilepsia do lobo temporal é subdividida em epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) cujo foco incide no sistema límbico; e epilepsia do lobo temporal lateral (ELTL) oriunda de alterações no neocórtex.

A ELTM compreende a 60% das ELT, e em até 70% das vezes está associada a uma perda seletiva de neurônios piramidais (esclerose hipocampal -HS) (VALENÇA et al., 2006). Estudos retrospectivos de séries cirúrgicas mostram a ocorrência de “incidentes precipitantes iniciais” (IPIs), como, geralmente antes dos 5 anos de idade, como fatores causadores de ELTM com HS (WIESER et al., 2004). O SE, por exemplo, deflagra um processo progressivo – epileptogênese – de alterações estruturais e fisiológicas no sistema nervoso central que culmina na conversão do cérebro normal em um cérebro epileptogênico (FRENCH et al., 1993; LEITE et al., 1990).

Essas alterações ocorrem de forma pronunciada no hipocampo, incluído além da esclerose hipocampal, processos neurobiológicos como astrogliose, plasticidade axonal e dendrítica, neurogênese, neuro inflamação e uma reorganização global da expressão gênica. Os mecanismos subjacentes a essas alterações e o seu papel tanto na epileptogênese quanto na manutenção da condição epileptogênica tem sido alvo de muitos estudos experimentais e clínicos. De fato, dispomos de uma diversidade de protocolos experimentais de indução da epilepsia em animais, que modelam os diferentes aspectos do processo epileptogênico.

2.3. Modelo experimental de epilepsia do lobo temporal mesial

Existem diversos tipos de modelos experimentais de epilepsia ou de crises epilépticas. Esses modelos irão induzir uma série de eventos moleculares e estruturais, que irão resultar em modificações nas propriedades e redes neuronais, tornando-as epileptogênicas (VENTURIN, 2008). Esses modelos podem ser classificados como agudo ou crônicos, no primeiro, o animal apresenta crises apenas durante a ação do agente indutor, no segundo modelo, as crises ocorrem mesmo após a indução, podendo acompanhar toda a vida do animal (CAVALHEIRO et al., 1991).

Nos principais modelos experimentais, a epilepsia é consequência de um dano encefálico induzido por um episódio agudo de SE, que pode ser desencadeado por aplicação de convulsivantes químicos, como pilocarpina e cainato, ou por estimulação elétrica (*Kindling*) (COULTER et al., 2002). A indução por pilocarpina (PILO) é um dos mais utilizados e que mais se aproxima da ELT. A pilocarpina é um agonista colinérgico muscarínico extraído da planta *Pilocarpus jaborandi*, que quando injetada em altas doses (300 mg/Kg), produz alterações comportamentais, eletrográficas e morfológicas que muito se assemelham as encontradas na ELT em humanos (PIMENTA, 2009).

Esse modelo de epilepsia é composto por três fases distintas: a primeira delas é caracterizada pela ocorrência de crises que evoluem para o SE, que se instala cerca de 40 minutos após a injeção de pilocarpina e dura em média entre 10 e 12 horas, denominada fase aguda. A segunda fase do modelo é a fase latente, onde os animais passam um período sem apresentar nenhum evento de crise epiléptica, neste período ocorrem diversas alterações estruturais, neuroquímicas e celulares, e dura aproximadamente 15 dias. A última fase, denominada fase crônica, inicia com o

surgimento da primeira crise espontânea, que recorre por toda a vida do animal (CAVALHEIRO et al., 1991).

Associado à pilocarpina, usa-se o cloreto de lítio, que pode ser administrado em um intervalo de tempo entre 2 e 24 horas antes da injeção de PILO. O lítio tem a capacidade de potencializar o efeito da pilocarpina durante o SE, reduzindo a dose necessária de PILO em até 10 vezes. Ainda, o uso do modelo de lítio-pilocarpina, reduz a mortalidade dos animais e evita muitos efeitos colaterais associados a altas doses de pilocarpina (VENTURIN, 2008 *apud* CHAUDHARY et al., 1999).

2.4. A microbiota intestinal

O corpo humano abriga uma grande quantidade de micro-organismos, esses micro-organismos estão presentes em diferentes órgãos e tecidos, sendo encontrados em maior número na região do trato gastrointestinal. Essa população de bactérias recebe o nome de microbiota intestinal. Em sua maioria encontram-se bactérias anaeróbicas, como os gêneros: Bacteroides, Bifidobacterium, Eubacterium, Costridium, entre outros (NUNES, BERTOLIN, 2021).

De fato, cada indivíduo apresenta uma composição bacteriana distinta, o que gera uma grande variabilidade intra e interindividual, sendo definida geneticamente e por características individuais e ambientais, como a forma de nascimento (parto normal ou cesariana), idade e hábitos alimentares (MORAES, 2014). As bactérias que predominam o ambiente gastrointestinal são em grande parte anaeróbicas pertencentes aos filos Firmicutes e Bacteroidetes. Também são encontrados em menor quantidade os filos Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria e Verrucomicrobacteria (LANDEIRO, 2016).

A microbiota intestinal inicia seu estabelecimento logo após o nascimento, quando o organismo ainda é estéril. Durante o nascimento, o indivíduo tem acesso aos seus colonizadores primários: *E. coli* e *Enterococcus*. Após o nascimento, o indivíduo passa a ter acesso aos seus colonizadores secundários: *Bacteroides*, *Clostridia* e *Bifidobacterium*. Em torno de 2 anos de idade, a composição do microbiota é definida e se mantém estável ao longo da vida, com predominância dos filos Bacteroidetes e Firmicutes (PAIXAO; CASTRO, 2016 *apud* TANNOCK, 1999).

A colonização bacteriana é realizada por sítios de adesão específicos que são determinados geneticamente e podem sofrer interferências ou causar alterações nos receptores de células da mucosa. As espécies que se encaixam nesses sítios colonizam de forma permanente o intestino e torna-se a microbiota natural do TGI (BRANDT; SAMPAIO; MIUKI, 2006; ANDRADE, 2010). A aderência dos micro-organismos na parede do intestino é um elemento que controla a composição das comunidades bacterianas intestinais. Algumas bactérias apresentam adesinas (complexo protéico responsável pela adesão) que possibilitam o reconhecimento de células da mucosa, sendo possível a adesão da bactéria na parede do intestino e permitindo sua multiplicação (PAIXAO; CASTRO, 2016).

A microbiota é essencial para o organismo humano e dentre suas funções, destacam-se: desenvolvimento e funcionamento do sistema imune inato e adquirido, distribuição da gordura corporal, absorção de nutrientes, metabolismo de lipídios, proteção contra lesões nas células epiteliais, manutenção da homeostase do intestino, proteção contra agentes patogênicos, modulação da motilidade intestinal, e ainda é extremamente importante na transmissão de sinais para o cérebro, que ocorre na comunicação entre o TGI e o sistema nervoso central (SNC) através do eixo microbiota-intestino-cérebro (LANDEIRO, 2016).

2.5. Metaboloma intestinal

O metaboloma representa o perfil de metabolitos presentes em células, tecidos e biofluidos, e é rotineiramente aplicado como uma ferramenta para a descoberta de biomarcadores. Os metabólitos são substratos e produtos do metabolismo que são responsáveis por funções celulares essenciais, como produção e armazenamento de energia, transdução de sinal e apoptose. Esses substratos podem ser produzidos

diretamente pelo organismo hospedeiro ou derivados de micro-organismos, xenobióticos, dietéticos e outras fontes exógenas (JOHNSON et al. 2016).

Uma das descobertas do Projeto Microbioma Humano foi que, embora a composição taxonômica da microbiota humana varie entre os indivíduos, as abundâncias das vias metabólicas são relativamente consistentes. Embora esta descoberta demonstre que as vias metabólicas são estáveis em todos os microbiomas humanos, a variação no potencial metabólico microbiano existe e pode ser importante para a resposta do hospedeiro a fatores ambientais e estados de doença (HUTTENHOWER et al. 2012).

Alguns estudos trazem achados que demonstram o impacto da microbiota intestinal no perfil metabolômico de indivíduos. Wikoff e colaboradores (2009), em um estudo comparando o metaboloma de camundongos livres de germes e convencionais, trouxeram que inúmeros metabolitos surgiram exclusivamente nos os camundongos convencionais, devido à presença de microbiota intestinal. Um outro estudo, realizado por Marcobal e colaboradores (2013) identificou que os metabolomas fecais e urinários também diferem entre camundongos livres de germes, camundongos convencionais e camundongos com microbiota humanizada e que a introdução de apenas uma ou duas espécies bacterianas em camundongos livres de germes leva a mudanças no metaboloma.

As funções microbianas são refletidas diretamente na composição do metaboloma. Embora o corpo humano abrigue muitos microbiomas e metabolomas distintos, o intestino é o local mais diverso taxonomicamente, desta forma, o perfil do metabolismo bacteriano de um indivíduo é concentrado nesta região (LEE-SARWAR et al. 2020).

2.6. Eixo microbiota-intestino-cérebro

O eixo microbiota-intestino-cérebro consiste em um sistema de comunicação bidirecional entre a microbiota e o sistema nervoso central por intermédio de informações neurais, endócrinas e metabólicas (BERCIK et al., 2012). O cérebro regula a microbiota intestinal alterando a proliferação e virulência do microbiota; e a permeabilidade do trato intestinal aos micro-organismos através do nervo vago e principalmente pela ação hormonal (CHEN et al., 2015).

Por outro lado, a microbiota intestinal influencia o cérebro por intermédio de diferentes mecanismos, incluindo a secreção de metabolitos e neurotransmissores; e a estimulação da liberação de fatores inflamatórios pelas células do sistema imune da

mucosa intestinal. Todos esses mecanismos necessitam que os micro-organismos, ou seus produtos, se estendam a camadas do intestino como a camada mucosa, epitelial e a lâmina própria, de forma que ativem fatores que terá impacto a nível cerebral (LANDEIRO, 2016).

As bactérias intestinais são capazes de produzir diversos neurotransmissores e neuromoduladores como produtos secundários de seu metabolismo. Sabe-se que *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. produzem ácido gama-aminobutírico (GABA), *Streptococcus* spp., *Escherichia* spp. e *Enterococcus* spp. produzem serotonina, *Bacillus* spp. produz dopamina, *Escherichia* spp. e *Bacillus* spp. produzem noradrenalina e *Lactobacillus* spp. produz acetilcolina (LYTE, 2011).

A comunicação bidirecional entre a microbiota intestinal e o cérebro já é fortemente reconhecida por muitos autores, destacando a importância da microbiota para o funcionamento do sistema nervoso central (SNC) (MARESE et. al, 2019). A disbiose intestinal – desequilíbrio da composição da microbiota- aumenta a liberação de toxinas, a inflamação e a permeabilidade do epitélio intestinal, ativando o sistema nervoso parassimpático e os neurônios aferentes da medula espinal, que são responsáveis por modular o SNC e o sistema nervoso entérico (SNE), regulando as características epiteliais intestinais (LANDEIRO, 2016). A disbiose também interfere na produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias. A permeabilidade do intestino possibilita a penetração de antígenos e produtos bacterianos, causando um quadro inflamatório (MILLER e RANSON, 2016).

A permeabilidade intestinal aumentada se apresenta como ponto chave da interação entre a microbiota, o intestino e o cérebro, uma vez que, quando alterado, esse sistema é porta de entrada para bactérias presentes no intestino e seus produtos metabólicos entrem em contato com o sistema imunológico, a corrente sanguínea e outras vias neurais, modulando seu funcionamento (YARANDI et al. 2016). Alterações na composição da microbiota induzidas pelo estresse podem afetar o cérebro e o comportamento, citocinas inflamatórias perturbam a neuroquímica do cérebro e tornam os indivíduos mais vulneráveis à transtornos neurológicos (JONGE, 2013).

Em suma, uma série de produtos é gerada pela microbiota intestinal e exercem forte influência no SNC. Esses produtos podem ser capazes de desencadear sinais que

ultrapassam a barreira intestinal e atuam diretamente no SNC após cruzar a barreira hematoencefálica. Os resultados desta interação podem ser a nível imunológico, aumentando ou diminuindo processos inflamatórios, ou a nível de sinalização de neurotransmissores (ÁLVAREZ; ALONE, 2019).

A comunicação entre o cérebro e a microbiota intestinal tem sido implicada na regulação emocional, ansiedade, funções cognitivas além de outras situações patológicas, como o transtorno do espectro autista, déficit de atenção, hiperatividade, Parkinson, Alzheimer, AVC, epilepsia, esclerose múltipla e depressão (OSADCHIY et al., 2019).

2.7. Microbiota e epilepsia

A relevância da microbiota nas epilepsias foi revelada a partir de relatos clínicos sobre o efeito de antibióticos na modulação das crises epiléticas. O uso de antibióticos foi associado à diminuição da frequência das crises em pacientes portadores de ELT resistentes às drogas antiepiléticas (DAEs) (BRAAKMAN; VAN INGEN, 2018). Tais estudos apontaram para uma correlação entre as bactérias presentes na microbiota intestinal e a epileptogênese. O potencial terapêutico dessa relação também vem sendo explorado em estudos recentes sobre a ação dos probióticos no controle das crises epiléticas.

Um estudo piloto realizado por Gómez-Eguílaz e colaboradores (2018) demonstrou redução de crises epiléticas após uso de probióticos. O estudo contou com 45 pacientes que apresentavam etiologias diversas para epilepsia. Durante 4 meses foram administrados a esses pacientes probióticos de 8 espécies bacterianas diferentes. Como resultado, identificaram uma redução >50% das crises epiléticas em 28,9% dos pacientes.

Além do mais, estudos tanto em pacientes quanto em modelos experimentais apontam que o efeito terapêutico da dieta cetogênica (DC) depende de uma mudança na composição da microbiota intestinal. Zhang et al. (2018) e Lindefeldt et al. (2019) identificaram mudanças taxonômicas e funcionais da microbiota após o tratamento com DC. Olson e colaboradores (2018) identificaram alteração na microbiota intestinal decorrente da ingestão da DC em modelos experimentais de crise aguda de epilepsia, o que correlacionou com a eficiência do tratamento dietético, ou seja, a composição da

microbiota intestinal foi importante para a redução das crises epiléticas após o tratamento com DC.

Tais achados abriram perspectiva para estudos funcionais baseados no transplante de fezes. Um relato de caso de um paciente com doença de Crohn e um histórico de 17 anos de convulsões mostrou que após transplante de microbiota, o paciente se apresentou livre de crises epiléticas por 20 meses, mesmo com interrupção do tratamento farmacológico (HE et al., 2017). Um estudo recente mostrou que o transplante da microbiota intestinal de animais submetidos a um estresse crônico acelera o abrasamento elétrico e aumenta a duração das crises dos animais abrasados.

Estes achados apontam para a relevância da microbiota intestinal no processo epileptogênico. Entretanto, os estudos sobre a composição MI na condição epilética são escassos e têm focado em pacientes farmacorresistentes. De fato, Peng et al. (2018), demonstraram que a microbiota intestinal de pacientes com epilepsia resistente a medicamentos difere dos pacientes sensíveis aos fármacos, com aumento de diversidade e abundância de espécies raras do filo Firmicutes.

Recentemente, um estudo demonstrou que o transplante de microbiota pode também aumentar a suscetibilidade a convulsões. Camundongos transplantados com microbiota de animais epiléticos, foram mais propensos a desenvolver o *Status Epilepticus* induzido por pilocarpina do que animais com microbiota normal (MENGONI, et al, 2021).

Com o objetivo de melhor compreender o processo epileptogênico, portanto, resta premente estudos que busquem caracterizar as assinaturas de microbiota (e de seus produtos) associados ao estabelecimento e manutenção da condição epilética. Tais estudos são importantes para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que trazem como alvos determinadas táxons/produtos da microbiota intestinal.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral: Avaliar a comunidade bacteriana e o perfil metabólico nas fezes de ratos induzidos ao modelo experimental de epilepsia do lobo temporal por lítio-pilocarpina.

3.2. Objetivos específicos:

3.2.1. Avaliar a comunidade bacteriana de ratos antes e após a indução de epilepsia por meio de metataxonomia do gene 16S rRNA;

3.2.2. Realizar a predição funcional das vias metabólicas dos genes bacterianos;

3.2.3. Identificar metabólitos fecais antes e após a indução da epilepsia;

3.2.4. Correlacionar à comunidade bacteriana dos animais epiléticos com seu perfil metabólico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais e grupos experimentais

Os experimentos incluíram ratos com 60 dias de idade ($n = 12$, pesando entre 250 e 350 g) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Alagoas. Após 1 semana de adaptação, os animais foram alojados individualmente em microisoladores em estante ventilada, sob condições constantes de ciclo claro / escuro 12:12 h (luz acesa às 6h), temperatura ambiente de 22 ° C e umidade de 50-60 %. Os animais receberam comida e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos com os animais foram realizados por protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas (Permissão número: 13/2019) e estavam de acordo com as diretrizes normativas para experimentação animal do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal. Todos os esforços foram feitos para usar apenas o número de animais necessário para produzir dados científicos confiáveis. A saúde animal foi monitorada ao longo do período experimental e nenhum animal apresentou sinais clínicos / comportamentais de dor ou sofrimento inesperado.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos, experimental ($n = 6$) e Naïve ($n = 6$). A coleta de fezes foi realizada em dois momentos, antes da indução do SE (grupo pré-ELT) e 60 dias após a indução do SE, quando os animais apresentavam crises recorrentes espontâneas (grupo pós-ELT). Para o grupo Naïve, a coleta foi realizada nos horários correspondentes aos do grupo experimental (grupo Naïve-1 e grupo Naïve-2). As etapas do delineamento experimental estão representadas na figura 2.

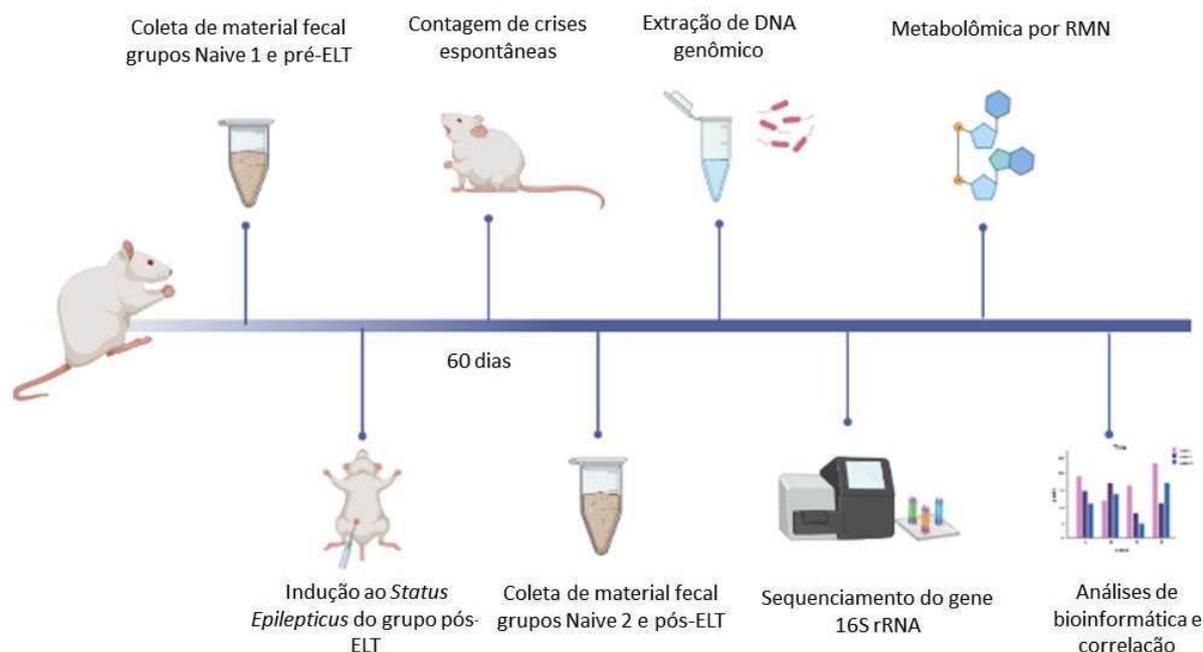


Figura 2. Etapas do delineamento experimental. 1: Coleta de material fecal de animais Naive t1 e pré-TLE; 2: Indução de *Status Epilepticus* por modelo lítio-pilocarpina; 3: Videomonitoramento para contagem de crises espontâneas; 4: Coleta de material fecal de animais Naive t2 e pós-TLE. 5: Extração de DNA genômico com protocolo de fenol/clorofórmio; 6: Sequenciamento do gene rRNA 16S através do sequenciador Illumina MiSeq; 7: Metabolômica por ressonância magnética nuclear; 8: Análise de bioinformática e correlação.

4.2. Indução do *Status Epilepticus* (SE)

O SE foi induzido nos animais do grupo epiléptico utilizando o protocolo de lítio-pilocarpina. A indução foi iniciada no ZT 2. Inicialmente foi administrada uma injeção intraperitoneal (i.p.) de cloreto de lítio (127 mg/kg) nos animais. Após 16 h, os ratos foram submetidos a injeção *i.p.* de butilbrometo de escopolamina (1 mg/kg), seguida por uma injeção de cloridrato de pilocarpina, na dose de 30 mg/kg (*i.p.*) 30 mins depois. A escopolamina foi utilizada para limitar os efeitos colinérgicos periféricos da pilocarpina. O SE foi abortado após 90 min de duração, com aplicação de diazepam (5 mg/kg; *i.p.*).

Após 30 dias da indução, todos os animais foram vídeo monitorados 8 h diárias, das 10:00 às 18:00 horas por 15 dias para avaliação do estabelecimento da fase crônica da epilepsia. Foram considerados epiléticos, os animais que apresentaram pelo menos 2 crises espontâneas de nível 3 ou mais. As variáveis duração e severidade das crises durante a fase crônica foram observadas e classificadas utilizando a escala de Racine (1972).

Tabela 2. Caracterização comportamental dos níveis de crises epiléticas em modelo animal segundo a escala de Racine (1972)

Nível de crise	Comportamento
0	Imobilidade
1	Automatismos faciais
2	Mioclonias de cabeça e pescoço
3	Clonias de patas anteriores
4	Elevação de patas posteriores
5	Elevação e queda

Ao final do experimento, todos os animais apresentaram crises espontâneas. As filmagens detectaram um total de 202 CREs, sendo 26% de nível 5, 12% de nível 4 e 62% de nível 3.

4.3. Coleta de material fecal

Para a coleta das fezes, os animais foram acondicionados em caixas individuais e higienizadas com cloro diluído (50%) e álcool 70%, onde permaneceram monitorados por um período de três horas, iniciando no ZT 7 e finalizando no ZT 10, e nenhum tipo de estímulo foi executado. As amostras coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para evitar proliferação de micro-organismos externos, e armazenadas a -80°C para posterior extração de DNA. Todas as coletas foram realizadas no mesmo ZT.

4.4. Extração do DNA genômico total e sequenciamento do gene 16S rRNA

O DNA genômico total foi extraído utilizando o método de extração por fenol/clorofórmio descrito por Sambrook e Russell (2001). A qualidade e a concentração do DNA extraído foram verificadas utilizando um espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). As bibliotecas do gene

16S rRNA V4 foram preparadas de acordo com o protocolo Illumina 16S *Metagenomic Sequencing Library Preparation protocol* (Illumina, 2013) usando iniciadores 515F-Y (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') (PARADA et al. 2016) e 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') (CAPORASO et al. 2011). A limpeza da PCR foi realizada utilizando o sistema Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter Genomics, EUA). Os produtos de amplificação foram utilizados como modelo para uma segunda PCR com os índices Nextera XT (Illumina, EUA). Os amplicons purificados foram agrupados em concentrações equimolares e foram sequenciados em pares de 150 bp na plataforma Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EUA) utilizando o MiSeq Reagent Kit v2 (ciclo 300), de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado na Central de Genômica e Bioinformática da Universidade Federal do Ceará, Brasil.

4.5. Processamento de dados de sequenciamento

As sequências brutas obtidas por meio da plataforma Illumina foram inicialmente processadas utilizando o pacote QIIME 2 (versão 2020.6) (BOLYEN et al., 2019). As amostras já demultiplexadas foram importadas e os oligonucleotídeos iniciadores e adaptadores removidos utilizando o plugin CUTADAPT. As *reads* foram filtradas (erro total esperado ou soma total das probabilidades de erro > 1), dereplicadas, as quimeras removidas e as *reads* de alta qualidade restantes unidas e agrupadas em *Amplicon Sequence Variants* (ASVs) com o plugin q2-DADA2 (CALLAHAN et al., 2016). As sequências representativas para cada ASV foram alinhadas e taxonomicamente anotadas usando banco de dados SILVA versão 138 previamente treinado como referência através do plugin *qiime feature-classifier classify-consensus-vsearch* nas configurações padrão (ROGNES et al., 2016). ASVs classificados como *singletons*, não-bactérias, mitocôndrias, cloroplastos ou não-anotados taxonomicamente foram removidos do conjunto de dados para análises posteriores.

Os dados de abundância diferencial foram avaliados utilizando o algoritmo DEseq2, considerando valores de p e FDR <0,05.

A composição da microbioma core foi avaliada utilizando o pacote PIME (Intervalo de Prevalência para Avaliação de Microbioma), que determina a melhor gama de prevalência prevista pelo seu algoritmo supervisionado de *machine learning Random*

Forest. Grupos responsáveis por dissimilaridades entre os grupos controle e experimental também foram determinados pelo PIME.

A diversidade alfa foi medida usando o índice de Chao1 e Shannon, e um teste Wilcoxon foi realizado para determinar se houve variação significativa nesses índices entre os diferentes tratamentos. O método de Escala multidimensional não métrica (nmMDS) usando a matriz de similaridade de Bray-Curtis foi utilizado para representar a diversidade beta, demonstrando graficamente as relações entre comunidades bacterianas, e posteriormente a Análise de Semelhanças (ANOSIM; CLARKE, 1993) foi aplicada para verificar diferenças entre a microbiota dos ratos nas condições antes e depois do estado epiléptico. O valor geral de R para esse teste varia de 1 a 0, com valores próximos de 1 indicando alta dissimilaridade entre as condições e valores próximos de 0 indicando que não tanta variação entre os grupos testados.

A ferramenta Análise Discriminante Linear (LDA) de tamanho de efeito (LEfSe) (SEGATA et al., 2011) foi usada para identificar gêneros com abundância relativa diferencial comparando amostras de indivíduos antes e depois da indução do estado epiléptico. A pontuação LDA foi calculada para gêneros com valores de $p \leq 0,05$ (limiar de pontuação LDA $\geq 2,00$). A análise de composição de microbiomas (ANCOM) foi realizada para comparar a composição dos microbiomas nos dois grupos experimentais. Essa metodologia leva em conta as restrições de composição na detecção de táxons diferencialmente abundantes em um nível de ecossistema (MANDAL et al., 2015).

A análise de predição funcional foi realizada utilizando a plataforma online PIPHILLIN pipeline (IWAI et al., 2016) para estimar o conteúdo genético presente na comunidade bacteriana com base no banco de dados KEGG. A relação entre o conteúdo metagenômico entre os tratamentos foi então visualizada utilizando uma análise de componentes principais (PCA). Uma análise de abundância diferencial usando o algoritmo DESeq2 foi realizada para detectar genes que variaram de forma significativa entre os dois tratamentos.

4.6. Análise metabolômica por ressonância magnética nuclear (NMR).

A extração dos metabólitos foi realizada com 50 mg de fezes e 1200 μL de tampão fosfato foi homogeneizado utilizando vórtex (4 x 20 s). Após, a suspensão foi centrifugada durante 15 min a 14000 rpm a 4 °C, e armazenada a -80 °C até a análise espectroscópica de ^1H NMR.

Os espectros NMR foram adquiridos num espectrômetro Bruker 600 MHz Avance III (Bruker BioSpin, Alemanha) equipado com a sonda PA BBO 600S3 BBF-H-D-05 Z SP, operado a 600,13 MHz e 298 K. As experiências com supressão de água foram gravadas utilizando a sequência de impulsos NOESY (noesygprr1d) da espectroscopia Overhauser de melhoramento nuclear. Os parâmetros utilizados foram os seguintes: 256 digitalizações registadas após 4 digitalizações, 64k pontos de dados, largura espectral de 20,0290 ppm, atraso de relaxamento de 4 s, tempo de aquisição de 2,73 s, e tempo de mistura de 10 ms. Antes da aplicação da transformação de Fourier, os decaimentos de indução livre foram multiplicados por uma função exponencial equivalente a um fator de permeabilidade de linha de 0,3 Hz. O espectro de processamento foi realizado automaticamente na fase de correção e linha de base e calibrado para o TSP em δ 0,00 ppm, usando TopSpin 3,5 (Bruker BioSpin). Os picos foram identificados nos espectros unidimensionais utilizando o Human Metabolome Database (HMDB) (Wishart et al 2018) Versão 4.0 e o ChenomX NMR Suite (Chenomx Inc., Edmonton, Canadá).

O conjunto de dados foi processado utilizando o software estatístico R, versão 3.6.0 (<http://cran.rproject.org/>) com o pacote R mrbin (versão 1.5.0). O conjunto de dados ^1H NMR foi dividido em silos consecutivos de 0,03 ppm de largura fixa sobre a região, de 0,5 a 9,5 ppm. A região espectral entre 4,7 e 5,1 ppm (contendo o sinal de água residual) foi excluída. O conjunto de dados espectral foi analisado utilizando uma plataforma online MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) (Chong J et al 2019). Todas as intensidades dos contentores foram normalizadas por uma mediana para minimizar o efeito de diferentes concentrações.

A análise sem supervisão dos componentes principais (PCA) foi utilizada como primeira análise exploratória para obter uma perspectiva preliminar dos dados e facilitar uma visão geral sobre ambos os grupos através dos componentes principais (PC1 vs. PC2) em gráficos de pontuação, tendências reveladoras, e potenciais aberrantes. Ao mesmo tempo, as parcelas de carga forneceram uma perspectiva dos pesos das variáveis em cada componente. O modelo OPLS-DA (Orthogonal Partial Least-Squares Discriminant Analysis) foi realizado para avaliar a capacidade dos dados metabolômicos em distinguir o grupo de controle do epiléptico para o conjunto completo de metabólitos plasmáticos identificados. O intervalo de confiança definido foi de 95%, e 2000 permutações foram definidas para avaliação do modelo. As

diferenças nas concentrações dos metabólitos entre os grupos foi avaliada através de teste T.

A correlação entre microbiota-metaboloma foi verificada utilizando a plataforma MANTA (Análise de correlação de microbiota e fenótipos) e o teste de correlação de Spearman (CHEN et al., 2020). Os resultados foram representados graficamente utilizando a ferramenta web ClustVis.

5. RESULTADOS

A análise de sequenciamento resultou em um total de 2.166.287 leituras a 2.300 ASVs, com contagens médias de 90.261 *reads* por amostra. Tanto o grupo controle, quanto o epilético apresentaram uma alta abundância taxonômica, sendo identificados um total de 13 filos (Firmicutes, Bacteroidota, Proteobacteria, Desulfobacterota, Spirochaetota, Cyanobacteria, Patescibacteria, Campilobacterota, Actinobacteriota, Deferribacterota, Euryarchaeota, Elusimicrobiota, Fusobacteriota) em cada um dos grupos. Os filos mais abundantes foram Firmicutes e Bacteroidota. Quanto aos outros grupos taxonômicos, foram identificados 19 classes, 42 ordens, 59 famílias e 137 gêneros.

A análise de abundância diferencial identificou 2 filos significativamente diferenciados no grupo pós-TLE, sendo Desulfobacterota, aumentado após o estabelecimento da epilepsia (p 0.0038 e FDR 0.0251) e Patesbacteria, diminuído após estabelecimento da epilepsia (p 0.0020 e FDR 0.0251). Para os animais do grupo Naïve, não houve diferenças estatísticas (Figura 3A). Para o nível de gênero, também foi realizada análise de abundância diferencial, que identificou diferenças em 9 gêneros. *Mycoplasma*, *RF39*, *Candidatus Stoquefichus*, *Clostridium_senso_stricto1*, *Fusicatenibacter*, *Dubosiella*, *Turicibacter* e *Jeotigalicoccus*, diminuídos em animais epiléticos, e *Coriobacteriaceae_UCG_002*, aumentado na epilepsia. No grupo Naïve, apenas o grupo *Frisingicoccus* se diferenciou (Figura 3B).

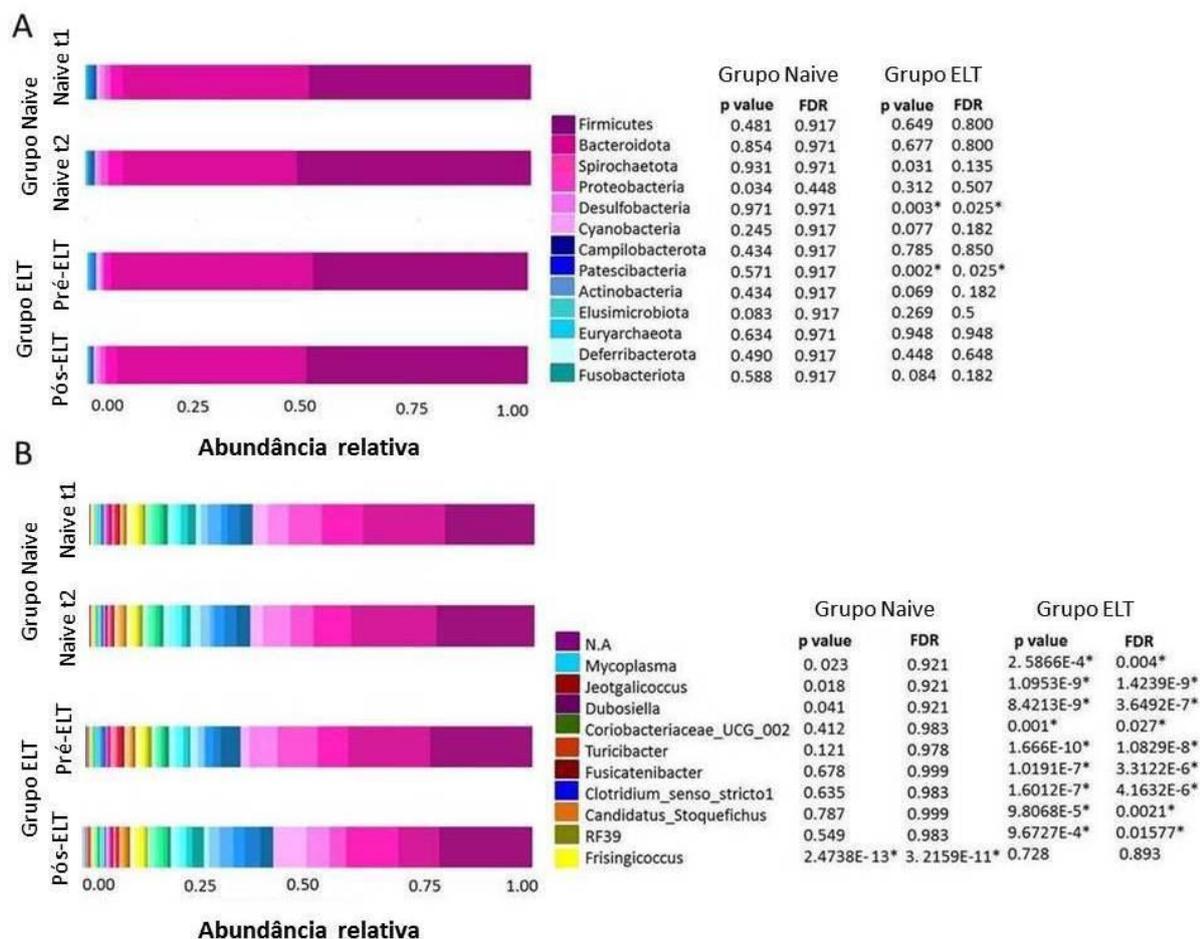


Figura 3: Perfil taxonômico dos grupos experimental (TLE) e Naïve nível de: A) filo e B) gênero. Ao lado dos gráficos encontram-se os resultados das análises de abundância diferencial. Um * indica taxas que mostraram variação significativa entre tempo 1 e tempo 2 de cada grupo experimental.

5.3. Análise LEFse

O método de análise discriminante linear do tamanho do efeito (LEFse) determina características que explicam as diferenças entre os grupos antes e após o estabelecimento da epilepsia, podendo sugerir possíveis biomarcadores microbianos para esta patologia. No grupo experimental, foram determinadas quinze características discriminativas em nível de gênero, que se diferiu em abundância antes e após a indução da epilepsia (Figura 5).

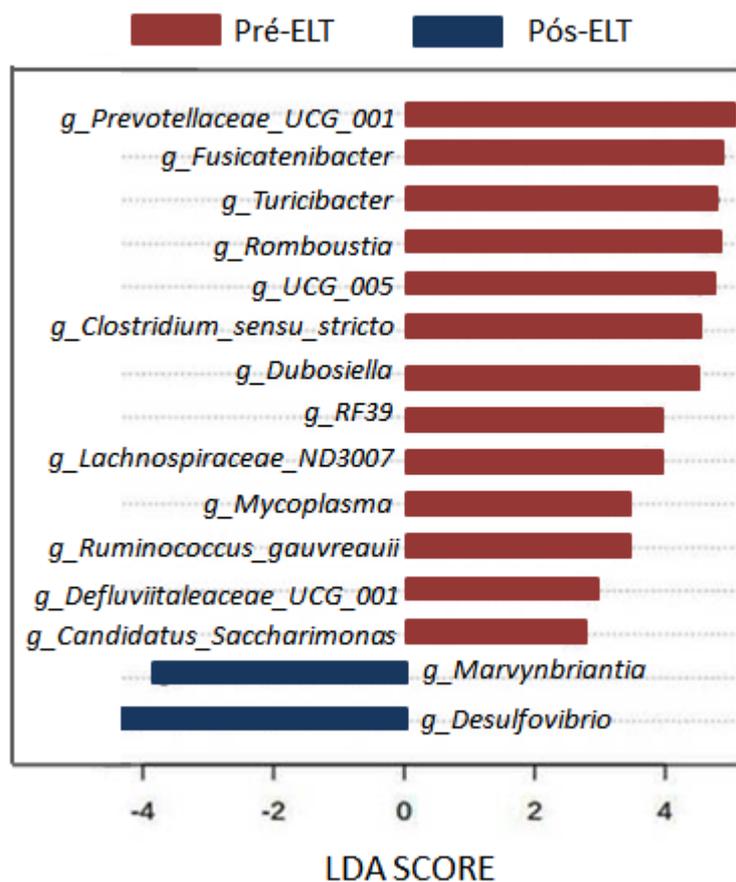


Figura 5. Gêneros bacterianos identificados por meio do método de análise discriminante do tamanho do efeito (LEFse) na microbiota intestinal dos grupos pré-TLE e pós-TLE.

Bactérias dos gêneros *Mavinbriantia* e *Desulfovibrio* foram encontradas em maior abundância após o estabelecimento da epilepsia, enquanto os outros gêneros identificados, como *Dubosiella*, *Mycoplasma*, *Fusicatenibacter*, *Prevotellaceae_UCG_001* e *Candidatus_Saccharimonas* foram diminuídos nos animais epiléticos.

4.3. Diversidade da microbiota intestinal

O índice Chao1 mostrou que a riqueza da microbiota foi significativamente reduzida após os animais se terem tornado epiléticos (pós-TLE versus grupo pré-TLE) (Mann-Whitney p-value < 0,05), enquanto que o índice Shannon não revelou diferenças estatisticamente significativas na diversidade (Figura 4A). Para o grupo naive, a

diferença na diversidade entre os dois pontos (Naïve t1 versus Naïve t2) não foi significativa tanto pelos índices de Chao1 como de Shannon (Figura 4B).

A análise da diversidade beta demonstrou, no grupo ELT, uma menor similaridade entre as amostras nos dois tempos do experimento, pré-ELT e pós-ELT, ($p < 0,027$ e $R = 0,166$), (Figura 4C). A maior homogeneidade entre as amostras do grupo controle, demonstrou que não houve grandes diferenças taxonômica entre as amostras ($p < 0,693$ e $R = -0,062$), (Figura 4D) As mudanças na diversidade identificadas no grupo experimental, sugerem que esta perturbação pode ter sido causada pelo processo de estabelecimento da epilepsia.

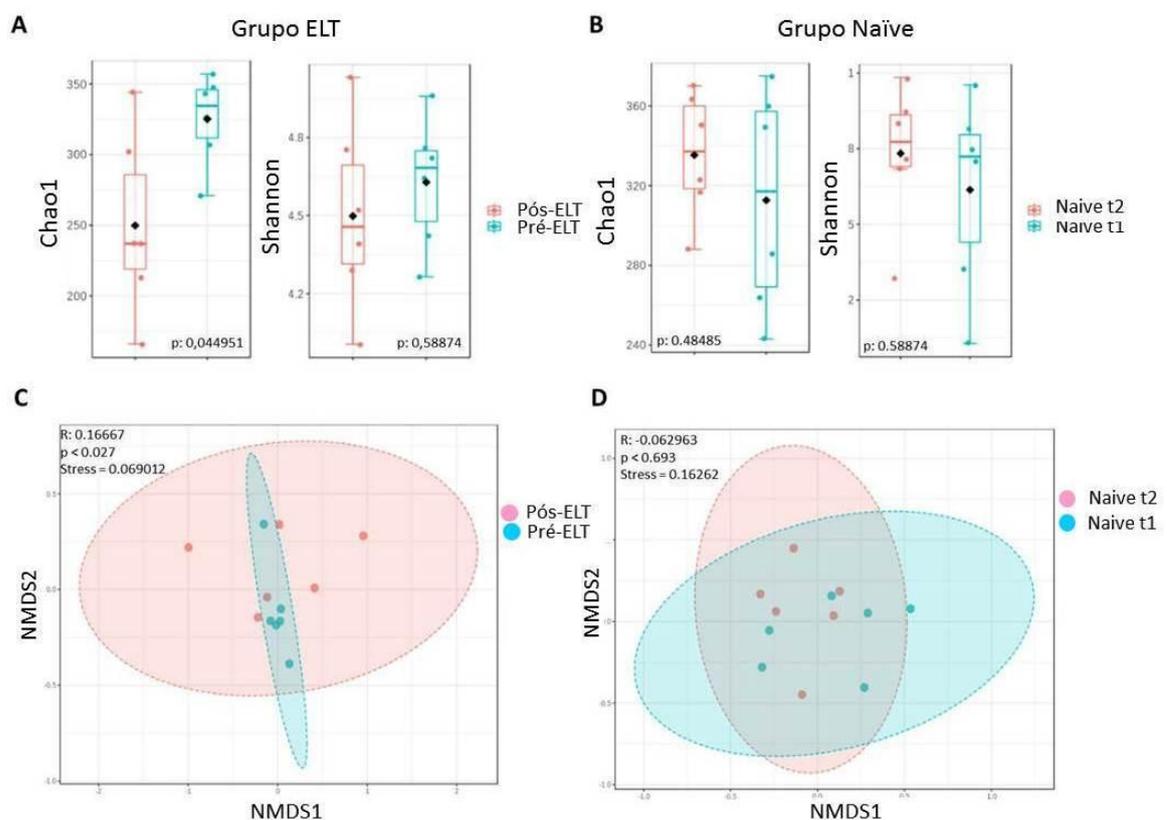


Figura 4: A e B) Chao 1 (estimador de riqueza) e índices de Shannon (diversidade) e o respectivo p-valor obtido através do teste Mann-Whitney comparando os resultados obtidos ao comparar os grupos ELT e Naïve entre t1 e t2, respectivamente. C e D) Escala Dimensional Não-Métrica (NMDS) e o respectivo valor da Análise de Similaridade (ANOSIM) dos grupos TLE e Naïve, respectivamente.

4.4. Análise composicional - ANCOM

Este teste consistiu em comparar a composição da microbiota entre os dois grupos antes e após o SE. A partir desta análise, percebeu-se a presença de ASV positivo do grupo dos animais epiléticos em comparação com os controles, com uma força estatística (valor de W) de 863. Organismos da família Lachnospiraceae foram identificados no grupo experimental antes da indução da epilepsia. Após o estabelecimento desta condição, os organismos pertencentes a esta família desapareceram (Figura 6).

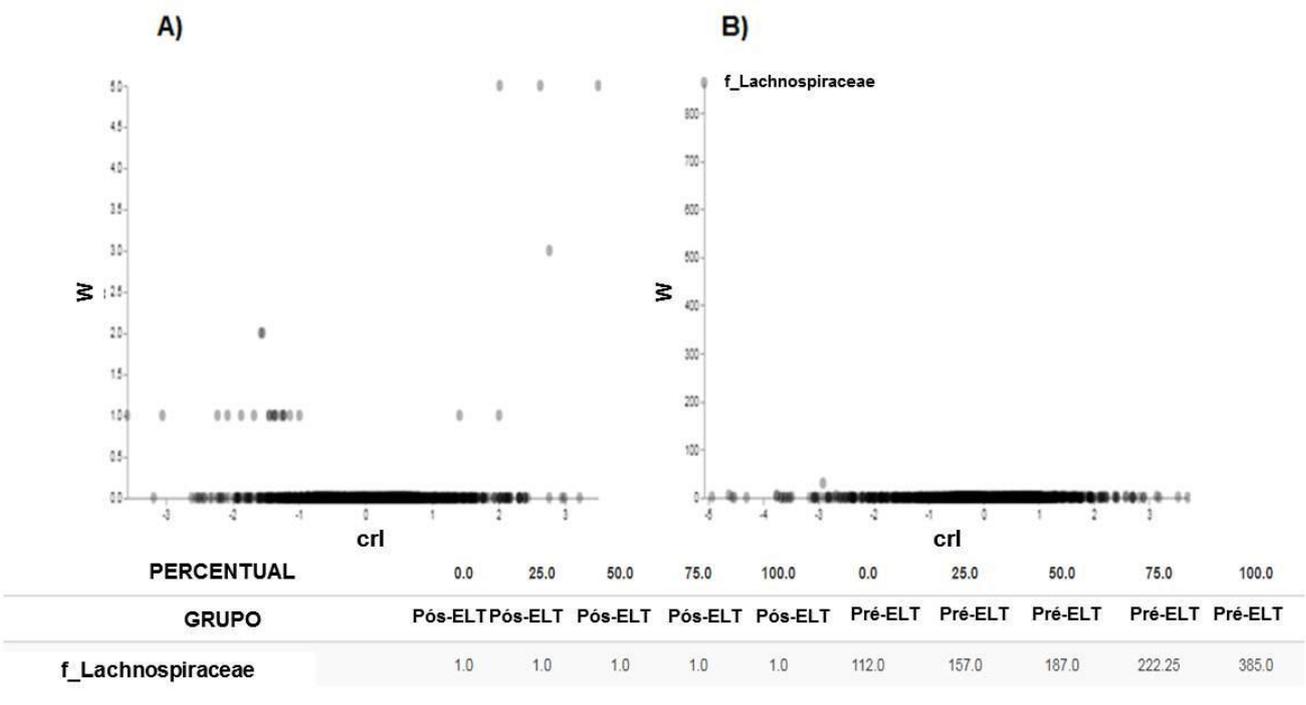


Figura 6. Análise comparativa da composição taxonômica bacteriana da microbiota intestinal de ratos do grupo naive (A) e experimental (B).

O valor ‘crl’ indica a mudança na composição, e valor de ‘W’ a força estatística. Foi considerado significativo o valor de W=863.

4.5. Microbioma core

A análise de microbioma core corresponde aos táxons presentes de acordo com determinado valor de prevalência identificados entre todas as amostras propostas. O melhor intervalo de prevalência calculado para ambos os grupos ELT e Naive foi de 70% (OOB = 0). Observamos que 224 ASV's representam a microbiota nuclear de todos

os ratos utilizados no experimento. O grupo TLE mostrou uma diminuição de 83 ASV's antes do experimento para 52 ASV's após o início das CREs. Por outro lado, o grupo dos naïves mostrou um aumento de 53 ASV's para 71 ASV's da primeira para a segunda amostragem, respectivamente (Figura 7). A importância dos ASV's para diferenciar entre os indivíduos pré e pós-TLE foi medida através da média de diminuição da precisão. ASV's pertencentes às famílias Lachnospiraceae, Clostridia_UCG-014 e Muribaculaceae estavam principalmente relacionados com o grupo pré-TLE, enquanto ASV's pertencentes a Erysipelotrichaeae, Ruminococcaceae e Muribaculaceae estavam relacionados com o grupo pós-TLE (Tabela 3). Já nos animais do grupo Naive, encontramos uma menor diversidade das famílias responsáveis por essa diferenciação entre os tempos 1 e 2, sendo Lachnospiraceae, Muribaculaceae e Oscillospiraceae os mais relacionados a essa diferenciação (tabela 4).

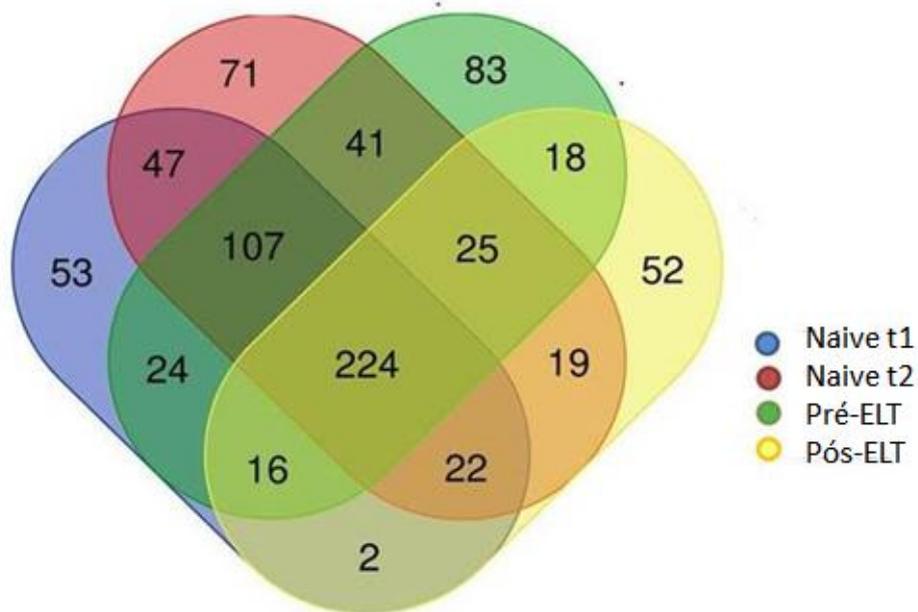


Figura 7: Diagrama de Venn mostrando o resultado das análises de microbiota core utilizando a percentagem de prevalência ideal (70%). É possível visualizar a quantidade de ASV's únicos de cada categoria e quantos são compartilhados entre eles.

Tabela 3. 30 principais gêneros bacterianos de acordo com a importância medida pela média de diminuição da precisão para diferenciar ratos pré-ELT e pós-ELT.

Tabela 3. Top 30 principais gêneros bacterianos de acordo com a importância medida pela média de diminuição da precisão para diferenciar ratos pré-ELT e pós-ELT.

Grupo pré-ELT	Grupo pós-ELT	Média de precisão	Família	Gênero
0.010	0.011	0.0100667	Erysipelotrichaceae	<i>Turicibacter</i>
0.008	0.010	0.0082000	Ruminococcaceae	<i>Pygmaibacter</i>
0.009	0.007	0.0079333	Clostridia_UCG-014	<i>Clostridia_UCG-014</i>
0.009	0.007	0.0076000	Oscillospiraceae	<i>Uncultured</i>
0.010	0.007	0.0075333	Lachnospiraceae	<i>Sellimonas</i>
0.010	0.006	0.0072333	Lachnospiraceae	NA
0.008	0.007	0.0071333	Prevotellaceae	<i>Prevotellaceae_UCG-001</i>
0.008	0.007	0.0070000	Lachnospiraceae	<i>[Eubacterium]_ruminantium_group</i>
0.008	0.006	0.0064000	Lachnospiraceae	NA
0.007	0.007	0.0063333	Muribaculaceae	<i>Muribaculaceae</i>
0.008	0.005	0.0061333	Muribaculaceae	<i>Muribaculaceae</i>
0.006	0.007	0.0060381	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>
0.005	0.007	0.0056667	Muribaculaceae	<i>Muribaculaceae</i>
0.004	0.007	0.0050667	Anaerovoracaceae	<i>[Eubacterium]_nodatum_group</i>
0.005	0.005	0.0049333	Muribaculaceae	<i>Muribaculaceae</i>
0.005	0.005	0.0046667	Oscillospiraceae	<i>Oscillospira</i>
0.005	0.004	0.0045333	Ruminococcaceae	<i>UBA1819</i>
0.005	0.004	0.0043333	Clostridia_vadinBB60_group	<i>Clostridia_vadinBB60_group</i>
0.006	0.003	0.0042667	Muribaculaceae	<i>Muribaculaceae</i>

0.003	0.005	0.0039333	UCG-010	<i>UCG-010</i>
0.006	0.003	0.0038000	Lachnospiraceae	<i>Roseburia</i>
0.004	0.003	0.0037333	Lachnospiraceae	NA
0.006	0.002	0.0036667	Acidaminococcaceae	<i>Phascolarctobacterium</i>
0.003	0.003	0.0034000	Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus</i>
0.004	0.004	0.0034000	Eggerthellaceae	<i>Enterorhabdus</i>
0.003	0.003	0.0033333	Muribaculaceae	<i>Muribaculaceae</i>
0.003	0.004	0.0033333	Christensenellaceae	<i>Christensenellaceae_R-7_group</i>
0.003	0.004	0.0033333	Clostridia_UCG-014	<i>Clostridia_UCG-014</i>
0.002	0.004	0.0031333	Peptococcaceae	<i>Uncultured</i>

Tabela 4. Top 30 principais gêneros bacterianos de acordo com a importância medida pela média de diminuição da precisão para diferenciar ratos naïve 1e naïve 2.

Naïve 1	Naïve 2	Média de precisão	Família	Gênero
0.012	0.015	0.0122000	Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae_ND3007_group</i>
0.011	0.012	0.0105333	Oscillospiraceae	<i>Oscillibacter</i>
0.011	0.011	0.0100000	Ruminococcaceae	<i>UBA1819</i>
0.012	0.009	0.0096000	Muribaculaceae	<i>Muribaculaceae</i>
0.010	0.009	0.0084667	Muribaculaceae	<i>Muribaculaceae</i>
0.007	0.008	0.0071333	Prevotellaceae	NA
0.007	0.008	0.0071333	Oscillospiraceae	<i>Colidextribacter</i>
0.005	0.009	0.0067429	Ruminococcaceae	<i>uncultured</i>
0.006	0.007	0.0064667	Desulfovibrionaceae	<i>uncultured</i>

0.009	0.006	0.0064667	Clostridia_UCG-014	<i>Clostridia_UCG-014</i>
0.005	0.009	0.0062667	Ruminococcaceae	<i>uncultured</i>
0.007	0.006	0.0058000	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>
0.006	0.006	0.0057333	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>
0.007	0.005	0.0056667	Prevotellaceae	<i>Prevotellaceae_UCG-001</i>
0.006	0.006	0.0054667	Lachnospiraceae	<i>uncultured</i>
0.005	0.006	0.0053333	Lachnospiraceae	<i>Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>
0.004	0.006	0.0050000	Ruminococcaceae	<i>Anaerotruncus</i>
0.004	0.006	0.0046667	Lachnospiraceae	NA
0.003	0.007	0.0046000	Oscillospiraceae	<i>uncultured</i>
0.005	0.004	0.0044000	Ruminococcaceae	<i>uncultured</i>
0.003	0.007	0.0043333	Muribaculaceae	<i>Muribaculaceae</i>
0.003	0.006	0.0043333	Lachnospiraceae	NA
0.004	0.005	0.0041333	Lachnospiraceae	<i>Roseburia</i>
0.0035	0.006	0.0040667	Muribaculaceae	<i>Muribaculaceae</i>
0.005	0.004	0.0039333	uncultured	<i>uncultured</i>
0.002	0.006	0.0034667	Lachnospiraceae	NA
0.004	0.003	0.0033333	Oscillospiraceae	<i>uncultured</i>
0.003	0.004	0.0031333	Eggerthellaceae	<i>uncultured</i>
0.003	0.003	0.0031333	Lachnospiraceae	NA
0.004	0.002	0.0031333	Lachnospiraceae	NA

4.6. Predição funcional

A análise de predição apontou um conteúdo de 6502 KO (genes ortólogos). Para avaliar a similaridade do conteúdo genético entre as amostras foi realizada análise de componentes principais (PCA). Esta análise demonstrou poucas diferenças entre os grupos experimentais, indicando que os diferentes tratamentos não geraram grandes

diferenças no conteúdo genético entre os dois tratamentos, exceto por dois animais específicos (Figura 9A).

Para verificar estes dados, foi feita uma análise individual de abundância diferencial usando DESeq2, com corte no valor de $p < 0.05$. O grupo epiléptico pós-ELT identificou diferenças significativas em 113 KOs correspondentes a 13 vias metabólicas diferentes (Figura 8B). Entre as vias identificadas, podemos destacar vias de metabolismo de aminoácidos, purina, pirimidina, metabolismo de alanina, aspartato, glutamato e metabolismo de D-glutamina e D-glutamato, sendo as últimas de grande importância para processos relacionados à epilepsia, como a neurotransmissão excitatória. O grupo controle não identificou nenhuma diferença significativa entre os dois tempos experimentais.

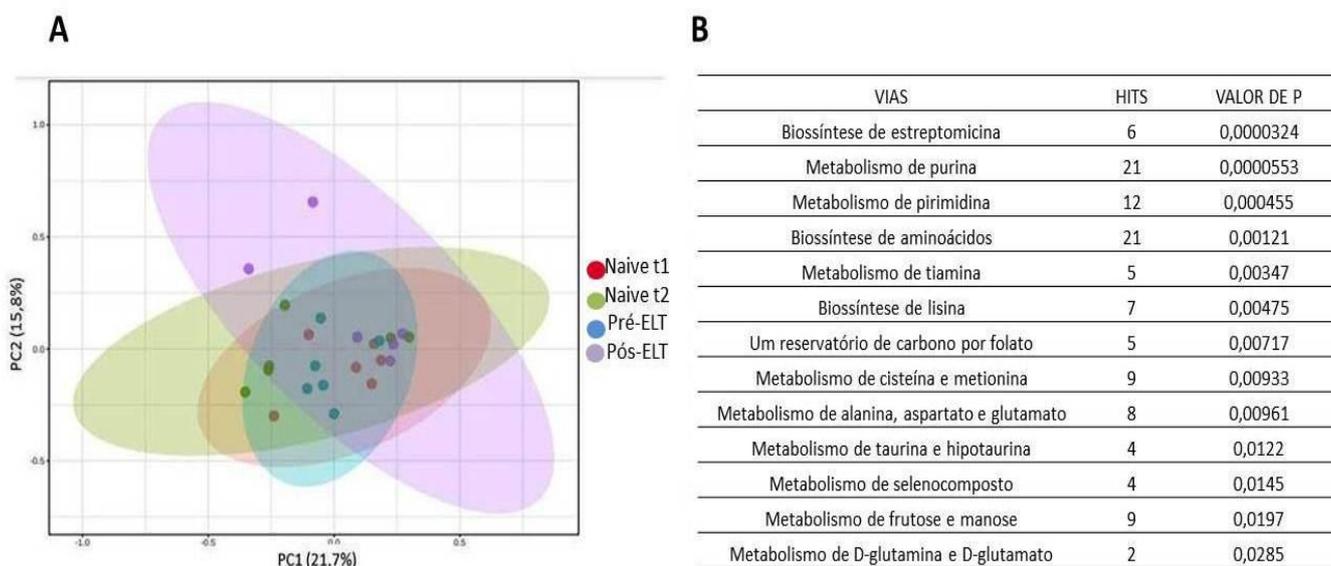


Figura 8: A) Análise das Coordenadas Principais (PCA) mostrando a relação entre amostras no que diz respeito aos dados obtidos através da previsão do conteúdo metagenômico. B) Vias funcionais previstas classificadas de acordo com a KEGG (Enciclopédia de Genes e Genomas de Quioto) que mostraram uma abundância diferencial significativa relacionada com o grupo TLE.

4.7. Análise metabólica

A análise metabólica foi realizada com os animais do grupo experimental (pré e pós-ELT). Inicialmente foi realizada uma análise exploratória dos dados através do

gráfico de scores e carregamento utilizando análise de componentes principais (PCA) (Figura 9A). Foram identificados um total de 9 classes de metabólitos sendo elas: Glicose, ácido láctico, etanol, ácido propiônico, ácido glutâmico, glicina, alanina, ácido acético, ácido butírico. O gráfico de carregamento (Figura 9B) mostrou que entre eles, 6 foram associados a variável epiléptica: ácido propiônico, ácido glutâmico, glicina, alanina, ácido acético, ácido butírico.

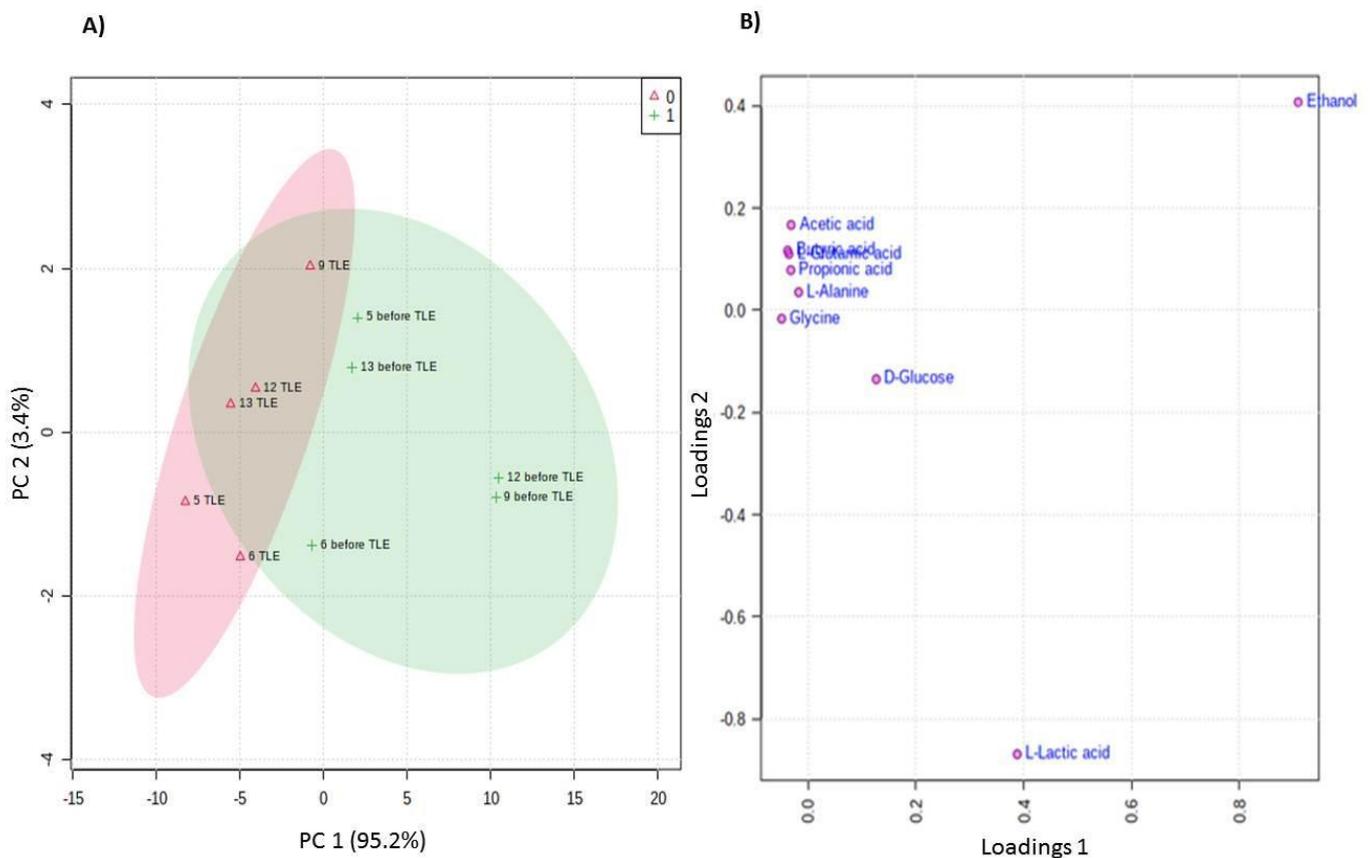


Figura 9. A) Análise de componentes principais (PCA) do perfil metabólico dos animais pré-ELT (verde) e ELT (vermelho). B) Gráfico de carregamento dos metabólitos identificados.

Para confirmar e aperfeiçoar a separação das amostras foi realizada análise OPLS (análise discriminante de mínimos quadrados parciais ortogonais), onde as amostras são comparadas umas com as outras, assim foram acentuadas as separações entre as amostras e das classes metabólicas identificadas (Figura 10A). Para validar o desempenho do modelo OPLS foi gerado um gráfico de permutações (Figura 10B). Este gráfico traz os valores de coeficiente de determinação (R^2) e de capacidade preditiva do modelo (Q^2). Para um desempenho satisfatório, estes valores devem ser maiores que 0,5. Neste trabalho obtivemos os seguintes valores: $R^2 = 0,976$ e $Q^2 = 0,922$ demonstrando que a OPLS obteve um desempenho muito satisfatório, o que nos sugere que o perfil metabolômico é influenciado pela condição epiléptica. .

Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis – OPLS

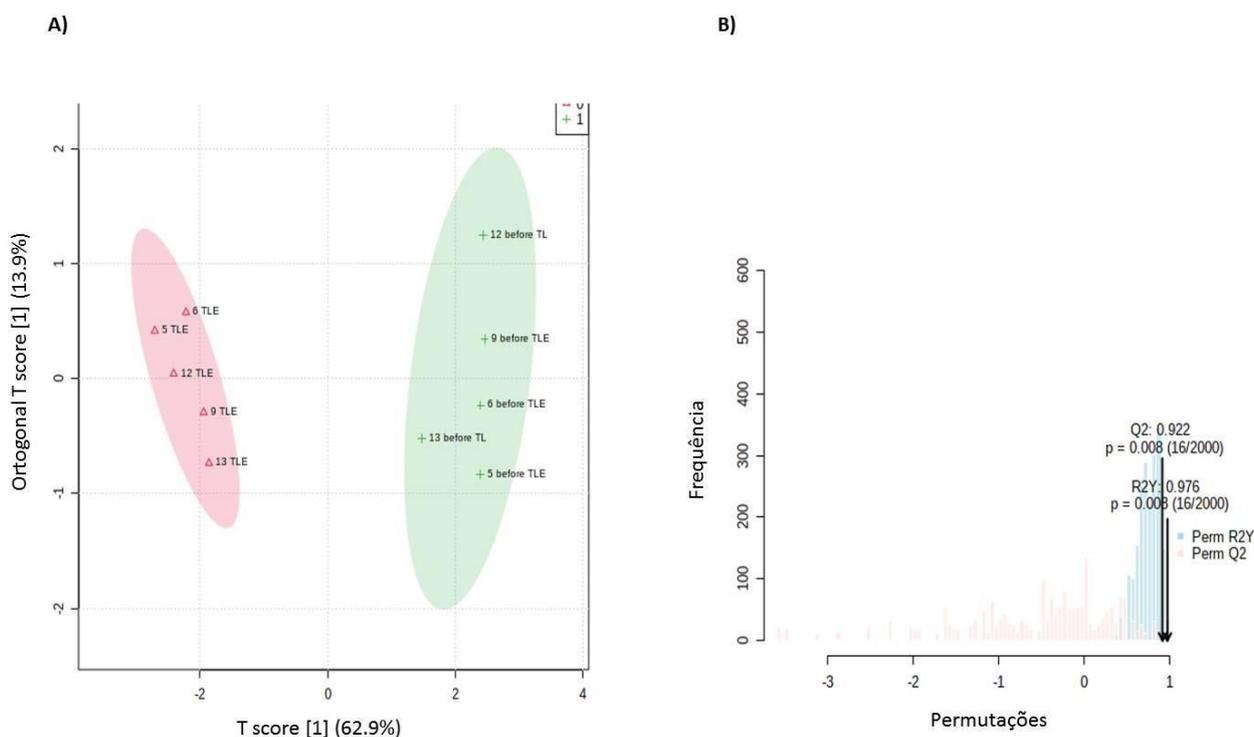


Figura 10. A) Análise discriminante de mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS) do perfil metabolômico dos animais pré-ELT (verde) e ELT (vermelho). B) Gráfico de permutação

Com a finalidade de identificar doenças relacionadas aos metabólitos identificados, foi realizada uma análise de enriquecimento de conjuntos de metabólitos. Nesta análise, foi identificado um total de 25 classes de doenças significativamente relacionadas as classes de metabólitos identificadas, entre elas, doenças gastrointestinais, neurológicas, ósseas, hepáticas e nefropatias. As maiores razões de enriquecimento foram identificadas em doenças como autismo, doença de Chron, síndrome do intestino irritável, gota, e colite ulcerativa (Figura 11).

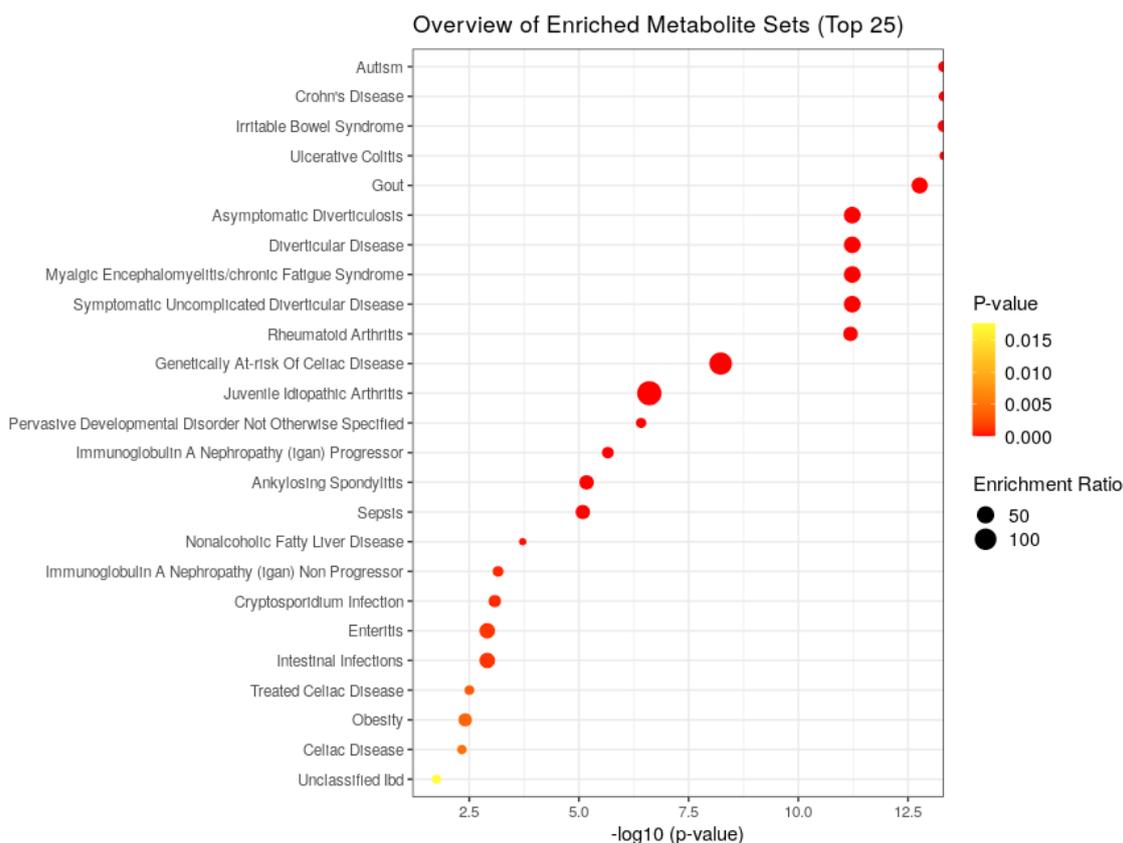


Figura 11. Análise de enriquecimento de conjuntos de metabólitos em relação a diferentes patologias.

Além do enriquecimento em doenças, analisamos o enriquecimento dos metabólitos em vias funcionais KEGG. Identificamos 11 vias significativamente enriquecidas. As vias relacionadas a glicólise, metabolismo de glutamato e glutamina, ácido butanoico, alanina, aspartato e piruvato foram as mais enriquecidas (Figura 12).

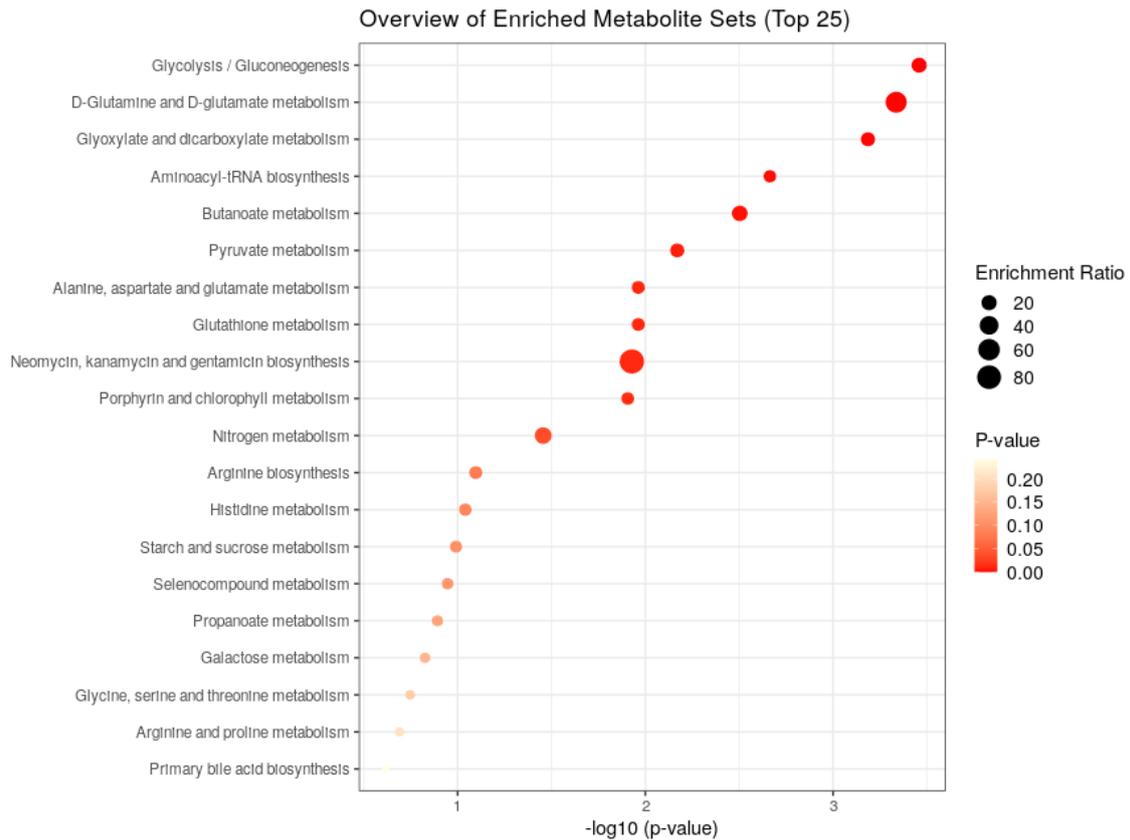


Figura 12. Análise de enriquecimento de conjuntos de metabólitos em relação a vias funcionais KEGG.

Por fim, foram comparados os níveis de concentração das classes dos metabólitos entre os grupos pré-ELT e pós-ELT (Figura 13). Todos os metabólitos se diferenciaram significativamente entre os grupos analisados. Confirmando os resultados anteriores, os níveis de glicose, ácido láctico e etanol foram diminuídos drasticamente em animais epiléticos, enquanto ácido acético, ácido propiônico, ácido glutâmico, alanina, ácido butírico e glicina foram aumentados durante o processo epileptogênico.

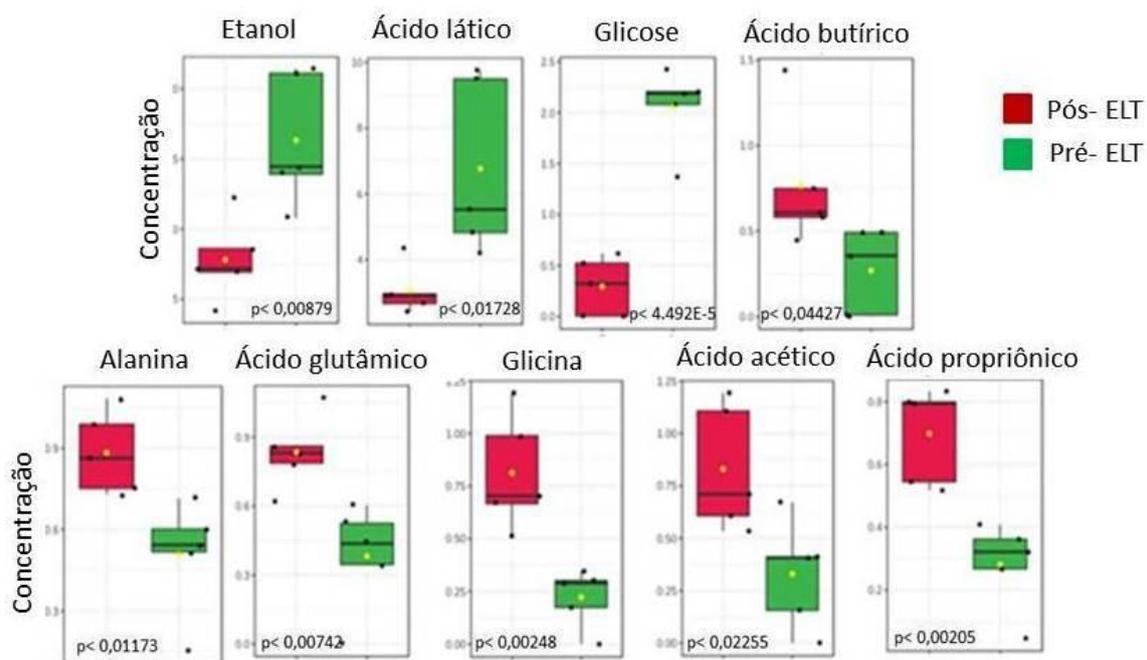


Figura 13. Concentração de metabólitos identificados nos animais pré-ELT (verde) e pós-ELT (vermelho).

4.8. Análise de correlação bactérias x metabólitos

Para explorar a relação entre as bactérias e os metabólitos, realizamos uma análise de correlação Spearman baseada em 18 gêneros e 9 metabólitos que se alteraram significativamente entre o grupo pré-ELT e o grupo pós-ELT. A cor vermelha demonstra correlação positiva e a cor azul correlação negativa, quanto maior o valor, mais forte é esta relação (Figura 14).

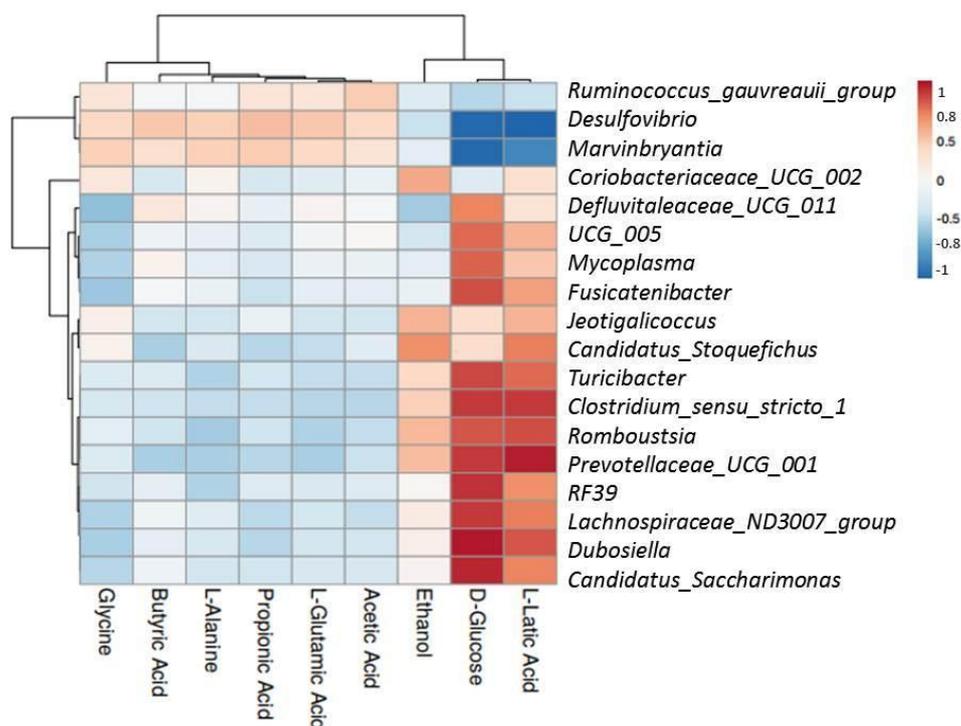


Figura 14. Mapa de calor mostrando a correlação entre os metabólitos identificados e os gêneros bacterianos significativamente diferenciados pós-ELT.

O metabolismo dos aminoácidos (alanina, glicina e ácido glutâmico) foi associado positivamente com *Desulfovibrio* e *Marvinbryantia*; e negativamente correlacionado com *Dubosiella*, *UCG-009*, *Candidatus Saccharimonas*, *RF39*, *Lachnospiraceae_ND3007_group*, *[Ruminococcus]_gauvreauii_group*, *Fusicatenibacter*. Ao contrário, o metabolismo energético (lactato e glicose) foi encontrado negativamente associado ao *Desulfovibrio* e *Marvinbryantia*; e positivamente correlacionado com *Dubosiella*, *Fusicatenibacter*, *RF39*, *Candidatus Saccharimonas*, *Lachnospiraceae_ND3007_group*, *Prevotellaceae_UCG_001* e *UCG_005*, *Turicibacter*, *Clostridium sensu stricto 1* e *Romboutsia*. Desta forma, os

resultados sugerem que a disbiose bacteriana em ratos pós-ELT pode modular o metaboloma fecal.

5. DISCUSSÃO

A microbiota intestinal é cada vez mais reconhecida como um importante contribuinte para a manutenção do estado epiléptico (AMLEROVA et al., 2021). Contudo, o papel da microbiota fecal na epilepsia é ainda mal compreendido devido a poucos e inconclusivos ensaios clínicos avaliando o bacterioma/metaboloma entre indivíduos epilépticos e saudáveis (DAHLIN E PRAST-NIELSEN, 2019). Aqui, utilizamos um modelo de rato com ELT induzida por SE bem caracterizado, para avaliar o perfil bacterioma/metaboloma intestinal antes e depois do início do CREs, utilizando uma abordagem multi-ômica. Os experimentos foram realizados de forma simultânea com animais Naïve para discriminar variações de microbiota intestinal devido a fatores extrínsecos que não o estado epiléptico.

As sequências metagenômicas revelaram mudanças taxonômicas, composicionais, e funcionais em ratos epilépticos. A disbiose microbiana associada à epilepsia foi avaliada através da caracterização da abundância relativa ao nível de filo e de gênero. Observamos que o filo Desulfobacterota estava significativamente em maior número no grupo ELT, enquanto que as Patescibacteria eram menos abundantes. Aparentemente, o nosso estudo foi o primeiro a relatar a distribuição alterada de Desulfobacterota e Patescibacteria associada a condições epilépticas.

As bactérias pertencentes ao filo Desulfobacterota têm sido associadas à beta-oxidação do butirato (HAO et al., 2020), um ácido gordo de cadeia curta (SCFA) produzido no cólon, e que pode melhorar a saúde cerebral em várias perturbações neurológicas através de um mecanismo multifuncional, incluindo a inibição de histonas desacetilases, ativação do receptor G acoplado à proteína (GPCR), liberação de serotonina e produção de ATP (BOURASSA et al., 2016). Um estudo recente mostrou um aumento significativo de Desulfobacterota em ratos com comportamento depressivo induzido pelo stress. Notavelmente, o tratamento destes ratos por transplante de microbiota fecal reduziu a abundância de Desulfobacterota assim como restabeleceu os níveis de 5-HT (RAO et al., 2021).

Além disso, foi relatado um enriquecimento de *Desulfobacterota* em doentes com retinopatia diabética, que provavelmente está relacionado com as lesões inflamatórias que acompanham esta perturbação metabólica (HUANG et al., 2021b). É bem conhecido o efeito tanto da neurotransmissão serotoninérgica como da inflamação na epilepsia (AKYUZ et al., 2021; BARKER-HALISKI et al., 2017). Em geral, o esgotamento de 5-HT e o aumento do estado pró-inflamatório estão relacionados com um limiar inferior de uma grande variedade de convulsões induzidas experimentalmente (BAGDY et al., 2007; CHUGANI e CHUGANI, 2005; VEZZANI et al., 2011).

O filo *Patescibacteria* compreende pequenas bactérias simbiotes da região do íleo (CHONG et al., 2020), cujos membros são mal caracterizados por serem extremamente difíceis de cultivar (SÁNCHEZ-OSUNA et al., 2017). Recentemente, alguns autores também relataram uma diminuição de *Patescibacteria* em condições patológicas, tais como pneumonia induzida (FENG et al., 2020) e na exposição de partículas de escape diesel (DEP) (VAN DEN BRULE et al., 2021). No entanto, a falta de informação sobre o papel das espécies de *Patescibacteria* intestinal na fisiologia (patogénica) cerebral prejudicada, propondo uma ligação mecanicista entre este filo e a epilepsia.

Em nível de gênero, foram identificados 18 gêneros significativamente enriquecidos entre os grupos pré-TLE e pós-TLE. Entre eles *Desulfovibrio* e *Marvynbrantia*, que foram aumentados no grupo pós-TLE. *Desulfovibrio* pertence a um grupo heterogêneo de bactérias gram-negativas redutoras de sulfato que foi encontrado enriquecido em condições neuro-inflamatórias (METWALY et al., 2020; Murros et al., 2021). *Desulfovibrio* compreende bactérias produtoras de lipopolissacarídeos (LPS) que desencadeiam a libertação de citocinas inflamatórias (ZHANG et al., 2018). A inflamação periférica induzida por LPS aumenta a susceptibilidade de convulsão através da indução de neuroinflamação pela produção de várias citocinas pró-inflamatórias no cérebro (HO et al., 2015).

Este gênero foi associado a desordens relacionadas ao neurodesenvolvimento, incluindo o transtorno do espectro autista, a partir da metabolização de ácido propiônico, um ácido graxo encontrado em níveis elevados em pacientes autistas (WATANABE et al. 2018). Observou-se também uma diminuição de *Desulfovibrio* em ratos modelo de epilepsia refratária tratada com dieta cetogénica (DC) (Olson et al.,

2018). Abundância do gênero *Mavinbryantia* também foi aumentada em camundongos que passaram por traumas cerebrais (TREANGEN et al. 2018). *Marvybiatria* compreende bactérias pró-inflamatórias que foram relatadas como positivamente correlacionadas com os níveis de várias citocinas na mucosa intestinal e negativamente correlacionadas com as capacidades antioxidantes (WANG et al., 2018; ZHANG et al., 2020).

Outros 16 gêneros foram diminuídos após o estabelecimento da epilepsia. Entre eles: *Turicibacter*, *Fusicatenibacter*, *Clostridium_senso_stricto1*, *RF39* e *Romboutsia*. Um estudo realizado por Gao et al. (2019), identificou que os gêneros *Turicibacter* e *Clostridium_senso_stricto1*, estão associados a quadro de disfunção cognitiva, estando correlacionados positivamente com o metabolismo de alanina, fenilalanina, glutamina, lactato, glicina e GABA no soro e hipocampo.

O gênero *Fusicatenibacter* abriga bactérias fermentadoras de açúcar, e apresentam ácido lático, ácido fórmico, ácido acético e ácido succínico como produtos da fermentação a partir da glicose (TAKADA et al. 2013). Bactérias do gênero *Fusicatenibacter* foram identificadas em menor abundância em pacientes com doença de Parkinson (WEIS et al., 2019) e em doenças intestinais, como a doença de Chron (QIU et al. 2020).

O gênero *RF39* ainda não foi totalmente descrito, mas sabe-se, até o momento que seus integrantes são relacionados positivamente com a produção de ácido indolepropiónico (IPA), um derivado do triptofano e regula a função da barreira intestinal (MENNI et al. 2019). O IPA foi identificado com ação neuroprotetora. O tratamento com este ácido antes da indução a isquemia cerebral em esquilos, protegeu significativamente o cérebro dos danos isquêmicos, e houve também redução nos níveis de GFAP (HWANG et al. 2009).

Para *Romboutsia*, ao contrário das nossas descobertas, um único estudo relatou um aumento deste gênero na microbiota fecal humana de pacientes com epilepsia em comparação com indivíduos saudáveis (GONG et al., 2020). Esta aparente incongruência pode ser devida à especificidade das espécies intestinais. De fato, vários estudos demonstraram que estas bactérias são significativamente reduzidas em ratos submetidos a lesões cerebrais traumáticas (DU et al., 2021) e em ratos com

comportamento depressivo induzido pelo stress (RAO et al., 2021), que são um determinante causal e comorbidade da epilepsia adquirida, respectivamente.

Os índices de diversidade α no grupo pós-ELT eram significativamente inferiores aos do grupo pré-ELT, medidos pelo índice de diversidade Chao1 para a riqueza de espécies. A diminuição da riqueza de espécies é uma característica comum da microbiota perturbada e tem sido relatada em doentes com epilepsia refratária em comparação com os controlos saudáveis (GONG et al., 2020; LINDEFELDT et al., 2019), bem como em estudos com outras condições neurológicas (HILL-BURNS et al., 2017; JANGI et al., 2016b; LIU et al., 2019). As análises da β -diversidade mostraram que o perfil do bacterioma fecal em ratos epiléticos foi separado dos anteriores à indução da ELT, o que concorda com os estudos humanos que comparam pacientes epiléticos e voluntários saudáveis (ARULSAMY et al., 2020; PENG et al., 2018; ŞAFKAK et al., 2020; XIE et al., 2017).

Identificamos o desaparecimento de táxons da família Lachnospiraceae nos animais epiléticos. Vários metabólitos correspondentes a diferentes táxons de Lachnospiraceae apresentam efeitos benéficos ou maléficos na saúde humana, como o fortalecimento da barreira intestinal, efeitos anti-inflamatórios por indução de células T, regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias, ativação do SN parassimpático e estimulação de secreção de insulina, aumento de toxinas relacionadas a doenças cardiovasculares e renais (VACCA et al., 2020). Táxons desta família já foram observados em menor número em pacientes com doença de Parkinson (PIETRUCCHI, 2019).

A análise de predição funcional PIPHILIN identificou diferenças em algumas vias responsáveis por funções metabólicas importantes nos animais epiléticos, como metabolismo de alanina, aspartato e glutamato, importantes no desencadeamento de crises epiléticas. Receptores de glutamato do tipo N-metil-D-Aspartato (NMDA) produzem no foco epilético alterações paroxísticas despolarizantes que são capazes de produzir descargas epiléticas durante a epileptogênese (PORTO et al., 2007). O sistema glutamatérgico também é capaz de diminuir as respostas dos receptores GABA, que se tornam incapazes de inibir o aparecimento de crises (FREITAS, 2011).

Outra via diferencialmente identificada foi a de metabolismo de tiamina. A tiamina atua como cofator para várias enzimas envolvidas na função cerebral e na

biossíntese de neurotransmissores. Vários estudos relataram que a deficiência de tiamina no sistema nervoso central reduz o limiar convulsivo e facilita o desenvolvimento de convulsões (MESDAGHINIA et al., 2019).

Também identificamos alterações nas vias de metabolismo de glutamina e glutamato. A glutamina é um aminoácido que age como um precursor para a síntese dos neurotransmissores glutamato e GABA, sendo chave na regulação da transmissão excitatória e inibitória no cérebro (EID et al., 2019). O glutamato é o aminoácido livre mais abundante do sistema nervoso central (SNC) e atua como principal neurotransmissor excitatório. Na epilepsia, o glutamato é um importante desencadeador de crises epilépticas e morte neural (VALLI, 2014).

O perfil metabólico da comunidade bacteriana no grupo experimental apresentou 6 metabólitos (ácido propiônico, ácido glutâmico, glicina, alanina, ácido acético, ácido butírico) mais concentrados nos animais com epilepsia estabelecida, enquanto glicose, ácido láctico e etanol diminuíram neste grupo.

Um estudo realizado por Murgia e colaboradores (2017), onde se avaliou o metaboloma do soro de pacientes com epilepsia, identificou aumento nos níveis de alanina, ácido butírico e glutamato e diminuição de glicose e ácido láctico, assim como no nosso estudo. A redução do metabolismo de glicose e ácido láctico na epilepsia sugere mudança de metabolismo de glicose no cérebro, para corpos cetônicos, como o ácido butírico. Este ácido já foi associado à síntese de serotonina e produção de citocinas inflamatórias (GUIDALI, 2019). Além disso, o glutamato se apresenta como um dos principais neurotransmissores excitatórios do cérebro.

A redução de substâncias energéticas e conseqüentemente dos níveis de ATP é um mecanismo importante subjacente à hiperexcitabilidade cerebral e pode levar a crises epilépticas (VAILLEND et al., 2002). Em estudos anteriores, foi demonstrado que a inibição dos cotransportadores de Na(+)/glicose (SGLT) aumentou a gravidade das convulsões límbicas no SE induzida por PILO, e que a administração de glicose alivia o SE (de MELO et al., 2021; MELO et al., 2016).

Também é interessante ressaltar que, na análise de predição funcional identificamos vias de alanina e glutamato diferencialmente expressas em animais epilépticos, e estes foram metabólitos identificados em níveis maiores em animais com a epilepsia estabelecida.

No atual estudo, observamos que *Desulfovibrio* estava negativamente correlacionado com glicose e lactato enquanto que os vários gêneros que estavam sub-

representados em ratos epiléticos (*Dubosiella*, *Candidatus Saccharimonas*, *Ruminococcus_gauvreauii_group*, *RF39*, *UCG_005 Lachnospiraceae_ND3007_group*, *Prevotellaceae_UCG_001*) foram encontrados positivamente correlacionados com estas fontes energéticas.

A nossa análise metabólica revelou um aumento significativo de glutamato e glicina em animais epiléticos. O glutamato, o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central, é um importante desencadeador de crises epiléticas e morte neuronal (ZHOU e DANBOLT, 2014). Observamos que o gênero *Desulfovibrio*, aumentado em abundância em animais epiléticos, está positivamente correlacionado com o glutamato, enquanto *Romboutsia*, *Clostridium sensu stricto 1*, *Turicibacter* e *Prevotellaceae_UCG_001*, que foram diminuídos, estão negativamente correlacionados. Glicina, um aminoácido não essencial desempenha um papel importante tanto nas sinapses inibitórias como excitatórias do sistema nervoso central (LÓPEZ-CORCUERA et al., 2001) e foi encontrado elevado no plasma de pacientes resistentes a drogas com epilepsia, provavelmente contribuindo para a ocorrência de convulsões (BOGUSZEWICZ et al., 2019).

Observamos também que *Marvybiantria*, aumentado em abundância em animais epiléticos, está positivamente correlacionado com glicina, enquanto *Dubosiella*, *Fusicatenibacter*, *Lachnospiraceae_ND3007_group*, *Ruminococcus_gauvreauii_group* e *Candidatus Saccharimonas* que foram diminuídos estão negativamente correlacionados.

Além disso, observamos que a família Lachnospiraceae que participa da produção de SCFAs benéficos foi reduzida após o início da epilepsia, o que pode melhorar a neuroinflamação. De fato, os nossos dados revelaram que os ratos epiléticos tinham uma depleção da bactéria anti-inflamatória *Fusicatenibacter* pertencente à família Lachnospiraceae. Este gênero foi capaz de suprimir a inflamação intestinal (TAKESHITA et al., 2016) e foi reduzido em outras doenças neuro-inflamatórias, tais como a doença de Parkinson (ROMANO et al., 2021). Apesar da diminuição das bactérias produtoras de SCFA, a nossa análise metabólica mostrou um aumento da concentração de ácido propiónico e butírico. Esta divergência entre a abundância de taxas produtoras de SCFA e as concentrações fecais de SCFA também

foi relatada noutras condições metabólicas (HUANG et al., 2021b; ZHAO et al., 2019) e continuará sendo investigada.

Os nossos resultados mostram uma alteração na composição da microbiota intestinal dos ratos que passaram pelo processo epileptogênico, possivelmente ocasionada por este insulto. Sabendo da relevância que a microbiota apresenta sobre a atividade cerebral, a sua disbiose pode implicar em consequências sobre o sistema nervoso, como também, processos neurobiológicos podem influenciar na sua composição.

A microbiota intestinal apresenta grande participação na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Alterações na microbiota levam a uma hiperativação do eixo HPA, causando interrupção dos circuitos neurais e dos níveis de neurotransmissores, produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias pelo sistema imunológico e ruptura da barreira intestinal (TONINI; VAZ; MAZUR, 2020). Com base nisso, moduladores de microbiota, como prebióticos e probióticos, vem sendo relacionados com a atenuação de sintomas oriundos de transtornos neurológicos, incluindo a epilepsia.

Apesar das limitações, as evidências já descritas mostram a estreita relação entre disbiose e epilepsia. Não podemos afirmar que a disbiose seja a causa (ou uma das causas) da epilepsia, mas podemos dizer que ela pode contribuir para o aparecimento de crises epiléticas. Desta forma, com o avanço dos estudos, o perfil da microbiota intestinal poderá servir como um potencial biomarcador no tratamento deste transtorno. Uma vez que o papel da microbiota na epilepsia for esclarecido, novos direcionamentos para tratamentos devem surgir, principalmente para casos de pacientes farmacorresistentes.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados apresentaram uma possível modulação da microbiota intestinal a partir do insulto epileptogênico, sugerindo que diversos táxons bacterianos possam ser facilitadores ou protetores em episódios de crises. Alguns dos táxons alterados já foram descritos como importantes no que diz respeito à sua interação com o cérebro, participando de processos patológicos de diversas desordens neurológicas, como o autismo, depressão, ansiedade, Alzheimer e epilepsia. Porém, a forma como as alterações da microbiota intestinal induzidas pela epilepsia poderiam modificar a atividade cerebral, aumentar a suscetibilidade a crises e facilitar a epileptogênese, ainda não está totalmente estabelecida. De toda forma, achados como este, podem colaborar no entendimento dos possíveis mecanismos que envolvem a epilepsia e a sua interação com a composição da microbiota intestinal, e subsidiar estudos a cerca desta relação, podendo abrir novas perspectivas terapêuticas para a epilepsia.

REFERÊNCIAS

- AKYUZ, E., et al., 2021. Revisiting the role of neurotransmitters in epilepsy: An updated review. **Life Sci.** 265:118826.
- AMBROGINI, P., et al., 2019. Excitotoxicity, neuroinflammation and oxidant stress as molecular bases of epileptogenesis and epilepsy-derived neurodegeneration: The role of vitamin E. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.** 1865(6):1098-1112.
- AMLEROVA, J., et al., 2021. Evidences for a Role of Gut Microbiota in Pathogenesis and Management of Epilepsy. **Int J Mol Sci.** 2021 May 25;22(11):5576.
- ANGELUCCI F, et al. Antibiotics, gut microbiota, and Alzheimer's disease. **J Neuroinflammation.** 2019 May 22;16(1):108.
- ARULSAMY, A., et al., 2020. Gut Microbiota and Epilepsy: A Systematic Review on Their Relationship and Possible Therapeutics. **ACS Chem Neurosci.** 11(21):3488-3498
- BAGDY, G., et al., 2007. Serotonin and epilepsy. **J Neurochem.** 100(4):857-73.
- BAGHERI, S., et al., 2019. Effect of probiotic supplementation on seizure activity and cognitive performance in PTZ-induced chemical kindling. **Epilepsy Behav.** 95:43-50.
- BAIZABAL-CARVALLO, J. F., ALONSO-JUAREZ, M., 2020. The Link between Gut Dysbiosis and Neuroinflammation in Parkinson's Disease. **Neuroscience.** 432:160-173.
- BARANDOUZI, Z. A., et al., 2020. Altered Composition of Gut Microbiota in Depression: A Systematic Review. **Front Psychiatry.** 11:541.
- BARKO, P.C.; MCMICHAEL, M.A.; SWANSON, K.S.; WILLIAMS, D.A. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. **J Vet Intern Med.** 32:9–25, 2018.
- BARTOLOMEI F, CHAUVEL P, WENDLING F. Epileptogenicity of brain structures in human temporal lobe epilepsy: a quantified study from intracerebral EEG. **Brain** p. 1818-1830, 2008.
- BEAM, J. P., et al. Ancestral Absence of Electron Transport Chains in Patescibacteria and DPANN. **Frontiers in microbiology** vol. 11 1848. 17 Aug. 2020, doi:10.3389/fmicb.2020.01848.

- BECKER, A. J., 2018. Review: Animal models of acquired epilepsy: insights into mechanisms of human epileptogenesis. **Neuropathol Appl Neurobiol.** 44(1):112-129.
- BOER AG, GAILLARD PJ. Blood-brain barrier dysfunction and recovery. **J Neural Transm (Vienna).** 2006 Apr;113(4):455-62. doi: 10.1007/s00702-005-0375-4.
- BOGUSZEWICZ, Ł., et al., 2019. NMR-based metabolomics in pediatric drug resistant epilepsy – preliminary results. **Sci Rep.** 9(1):15035.
- BOROWICZ-REUTT, K. K., CZUCZWAR, S. J., 2020. Role of oxidative stress in epileptogenesis and potential implications for therapy. **Pharmacol Rep.** 72(5):1218-1226.
- BOURASSA, M. W., et al., 2016. Butyrate, neuroepigenetics and the gut microbiome: Can a high fiber diet improve brain health? **Neurosci Lett.** 625:56-63.
- BRAAKMAN, H. M. H.; VAN INGEN, J. Can epilepsy be treated by antibiotics? **Journal of Neurology.** 265:1934–1936, 2018
- BRULE S, et al. Diesel exhaust particles alter the profile and function of the gut microbiota upon subchronic oral administration in mice. **Part Fibre Toxicol.** 2021 Feb 9;18(1):7. doi: 10.1186/s12989-021-00400-7.
- BURNEO, J. G., TELLEZ-ZENTENO, J., WIEBE, S., 2005. Understanding the burden of epilepsy in Latin America: A systematic review of its prevalence and incidence. **Epilepsy Res.** 66(1-3):63-74.
- CAVALHEIRO, E. A., et al. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia.** 1991.
- CHATZIKONSTANTINOOU, S., et al., 2021. The gut microbiome in drug-resistant epilepsy. **Epilepsia Open.** 6(1):28-37.
- CHEN, L., WANG, Y., CHEN, Z., 2019. Adult Neurogenesis in Epileptogenesis: An Update for Preclinical Finding and Potential Clinical Translation. **Curr Neuropharmacol.** 18(6):464-484.
- CHEN, Y.-A., et al., 2020. MANTA, an integrative database and analysis platform that relates microbiome and phenotypic data. **PLoS One.** 15(12):e0243609.

CHEUNG, S. G. et al. Systematic Review of Gut Microbiota and Major Depression. **Frontiers in Psychiatry**, vol. 10 34. 2019.

CHONG, C. Y. L., et al., 2020a. The microbial biogeography of the gastrointestinal tract of preterm and term lambs. **Sci Rep**. 10(1):9113.

CHONG, C.Y.L., et al. The microbial biogeography of the gastrointestinal tract of preterm and term lambs. **Sci Rep** 10, 9113 (2020).

CHONG, J., et al. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nature Protocols*, **15**, 799–821 (2020).

CHONG, J., WISHART, D.S., XIA, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. **Curr Protoc Bioinformatics**. 2019.

CHU, F., et al., 2018. Gut microbiota in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: current applications and future perspectives. *Mediators Inflamm*. 2018:8168717.

CLARK, A; MACH N. Exercise-induced stress behavior, gut-microbiota-brain axis and diet: a systematic review for athletes. **J Int Soc Sports Nutr**. 2016.

CONBOY, K., et al., 2021. Epigenetic principles underlying epileptogenesis and epilepsy syndromes. **Neurobiol Dis**. 148:105179.

COULTER, D. A., MCINTYRE, D. C., LOSCHER, W. Animal models of limbic epilepsies: What can they tell us? **Brain Pathology**, 2002

COX LM, et al. Description of two novel members of the family Erysipelotrichaceae: *Ileibacterium valens* gen. nov., sp. nov. and *Dubosiella newyorkensis*, gen. nov., sp. nov., from the murine intestine, and emendation to the description of *Faecalibaculum rodentium*. **Int J Syst Evol Microbiol**. 2017 May;67(5):1247-1254. doi: 10.1099/ijsem.0.001793.

DAHLIN, M., PRAST-NIELSEN, S. The gut microbiome and epilepsy. **EBioMedicine**. 2019 Jun;44:741-746. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.05.024.

de MELO, I.S., et al., 2021. Role of Modulation of Hippocampal Glucose Following Pilocarpine-Induced Status Epilepticus. **Mol Neurobiol**. 58(3):1217-1236.

DHARIWAL, A., et al. MicrobiomeAnalyst - a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data **Nucleic Acids Research** v. 45 p. 180-188. 2017.

DODIYA, H. B., et al., 2020. Chronic stress-induced gut dysfunction exacerbates Parkinson's disease phenotype and pathology in a rotenone-induced mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 135:104352.

DONATTI, A, et al. Circulating Metabolites as Potential Biomarkers for Neurological Disorders-Metabolites in Neurological Disorders. **Metabolites.** 2020;10(10):389.

DU, D., et al., 2021. Fecal Microbiota Transplantation Is a Promising Method to Restore Gut Microbiota Dysbiosis and Relieve Neurological Deficits after Traumatic Brain Injury. **Oxid Med Cell Longev.** 2021:5816837.

EID, T. et al. Astrocytes and Glutamine Synthetase in Epileptogenesis. **Journal of neuroscience research** vol. 97,11 (2019): 1345-1362.

EOR, J. Y, et al. Gut microbiota modulation by both *Lactobacillus fermentum* MSK 408 and ketogenic diet in a murine model of pentylenetetrazole-induced acute seizure. **Epilepsy Res.** 2021.

FATTORUSSO A, et al. Autism Spectrum Disorders and the Gut Microbiota. **Nutrients.** 2019 Feb 28;11(3):521..

FENG, J., et al. Shen-ling-bai-zhu-san ameliorates inflammation and lung injury by increasing the gut microbiota in the murine model of *Streptococcus pneumoniae*-induced pneumonia. **BMC Complement Med Ther** 20, 159 (2020). w.

FERNANDES, Maria José da Silva. Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas. *Estudos Avançados jornal.* São Paulo, v. 27, n. 77, p. 85-98, 2013.

FIEST, K. M., et al., 2017. Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. **Neurology.** 88(3):296-303.

FRANK, D. N.; PACE, N. R. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. **Current Opinion in Gastroenterology.** p. 4-10. 2008.

FREITAS, R. M. Neurotransmitter Systems Involved in Epilepsy Model: A Literature Review. **Rev Neurociências** p. 128-138. 2011.

FRENCH, J. A. et al. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. **Annals of Neurology.**, 34:774-780, 1993.

FUNG, T. C, et al. Intestinal serotonin and fluoxetine exposure modulate bacterial colonization in the gut. **Nat Microbiol.** (12):2064-2073. 2019.

GAO H, et al. Type 1 diabetes induces cognitive dysfunction in rats associated with alterations of the gut microbiome and metabolomes in serum and hippocampus. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.** 2019 Dec 1;1865(12):165541. doi: 10.1016/j.bbadis.2019.165541.

GARCÍA-GARCÍA, F., et al. Growth hormone improves hippocampal adult cell survival and counteracts the inhibitory effect of prolonged sleep deprivation on cell proliferation. **Brain Research Bulletin** 2011. V28843 p. 252-7.

GÓMEZ-EGUÍLAZ M, et al. The beneficial effect of probiotics as a supplementary treatment in drug-resistant epilepsy: a pilot study. **Benef Microbes.** 2018 Dec 7;9(6):875-881. doi: 10.3920/BM2018.0018.

GONÇALVES, M. A. P. **Microbiota – implicações na imunidade e no metabolismo.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 2014.

GONG, X., et al., 2020. Alteration of Gut Microbiota in Patients With Epilepsy and the Potential Index as a Biomarker. **Front Microbiol.** 11:517797.

GUPTA RS, GAO B. Phylogenomic analyses of clostridia and identification of novel protein signatures that are specific to the genus *Clostridium* sensu stricto (cluster I). **Int J Syst Evol Microbiol.** 2009 Feb;59(Pt 2):285-94. doi: 10.1099/ijs.0.001792-0.

HÄFELE, C. A., et al. Efeitos do exercício físico na epilepsia em humanos:: uma revisão sistemática. **Revista Neurociências**, 23(3), 328–336. 2015.

HAO, L., et al., 2020. Novel syntrophic bacteria in full-scale anaerobic digesters revealed by genome-centric metatranscriptomics. **ISME J.** 14(4):906-918.

HE Z., et al. Fecal microbiota transplantation cured epilepsy in a case with Crohn's disease: The first report. **World Journal Gastroenterol.** 2017 May 21;23(19):3565-3568.

HENSHALL, D. C. (2018). Epigenetic changes in status epilepticus. *Epilepsia*. 59 Suppl 2:82-86.

HO, Y.-H., et al., 2015. Peripheral inflammation increases seizure susceptibility via the induction of neuroinflammation and oxidative stress in the hippocampus. **J Biomed Sci.** 22(1):46.

HUANG C, et al. The effect of different dietary structure on gastrointestinal dysfunction in children with cerebral palsy and epilepsy based on gut microbiota. **Brain Dev.** 2021 Feb;43(2):192-199. doi: 10.1016/j.braindev.2020.09.013.

HUANG, Y. et al. Dysbiosis and Implication of the Gut Microbiota in Diabetic Retinopathy. **Frontiers in cellular and infection microbiology** vol. 11 646348. 19 Mar. 2021, doi:10.3389/fcimb.2021.646348.

HUTTENHOWER, C., *et al.* Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature** 486, 207–214 (2012).

HWANG IK, et al. Indole-3-propionic acid attenuates neuronal damage and oxidative stress in the ischemic hippocampus. **J Neurosci Res.** 2009 Jul;87(9):2126-37. doi: 10.1002/jnr.22030.

IANNONE, L. F., et al., 2020. The potential role of interventions impacting on gut-microbiota in epilepsy. **Expert Rev Clin Pharmacol.** 13(4):423-435.

ILAE 2017. Operational classification of seizure types. **Epilepsia**. p. 531-542, 2017.

IWAI, S., et al., 2016. Piphillin: Improved Prediction of Metagenomic Content by Direct Inference from Human Microbiomes. **PLoS One.** 11(11):e0166104. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166104>

JAMES, D. M., et al., 2021. The Gut-Brain-Microbiome Axis and Its Link to Autism: Emerging Insights and the Potential of Zebrafish Models. **Front Cell Dev Biol.** 9:662916.

- JANGI, S., et al., 2016. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. **Nat Commun.** 7:12015.
- JOHNSON, C. H. et al. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. **Nature reviews. Molecular cell biology.** vol. 17,7 (2016): 451-9.
- KASAHARA K, et al. Interactions between *Roseburia intestinalis* and diet modulate atherogenesis in a murine model. **Nat Microbiol.** 2018. 3(12):1461-1471.
- KHO ZY, LAL SK. The Human Gut Microbiome - A Potential Controller of Wellness and Disease. **Front Microbiol.** 2018;9:1835. Published 2018 Aug 14. doi:10.3389/fmicb.2018.01835.
- KNUDSEN, J. K., et al., 2021. Gut microbiota variations in patients diagnosed with major depressive disorder-A systematic review. **Brain Behav.** 11(7):e02177.
- LANDEIRO, J. A. V. R. Impacto **da microbiota intestinal na saúde mental.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz. 2016.
- LANZMASTER, D., et al. Metabolomics Biomarkers: A Strategy Toward Therapeutics Improvement in ALS. **Frente. Neurol.** 2018.
- LEE-SARWAR, K. A. et al. Metabolome-Microbiome Crosstalk and Human Disease. **Metabolites** vol. 10,5 181. 1 May. 2020.
- LEITE, J. P. et al. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews** v.14, n.4, p.511-7, 1990.
- LINDEFELDT, M. et al. The ketogenic diet influences taxonomic and functional composition of the gut microbiota in children with severe epilepsy. **NPJ biofilms and microbiomes** vol. 5,1 5. 2019
- ŁONIEWSKI, I., et al., 2021. Major Depressive Disorder and gut microbiota – Association not causation. A scoping review. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 106:110111.
- LÓPEZ-CORCUERA, B., et al., 2001. Glycine neurotransmitter transporters: an update. **Mol Membr Biol.** 18(1):13-20.

LUM , G. R. et el. Emerging roles for the intestinal microbiome in epilepsy. **Neurobiology of Disease**. p. 1-8, 2019.

LUM, G. R. et el. Emerging roles for the intestinal microbiome in epilepsy. **Neurobiology of Disease**. p. 1-8, 2019.

LYTE, M. Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: Microbial endocrinology in the design and use of probiotics. **BioEssays**. p. 574-581. 2011.

MACFARLANE S, MACFARLANE GT. Regulation of short-chain fatty acid production. **Proc Nutr Soc**. 2003 Feb;62(1):67-72. doi: 10.1079/PNS2002207.

MAHFOZ, A. M., SHAHZAD, N., 2019. Neuroinflammation impact in epileptogenesis and new treatment strategy. **Behav Pharmacol**. 30(8):661-675.

MAKI, J. J et al. Complete Genome Sequence and Annotation for *Turicibacter sanguinis* MOL361^T (DSM 14220). **Microbiology resource announcements** vol. 9,25 e00475-20. 18 Jun. 2020, doi:10.1128/MRA.00475-20.

MANIAR K, et al. Metformin exerts anti-obesity effect via gut microbiome modulation in prediabetics: A hypothesis. **Med Hypotheses**. 2017 Jul;104:117-120. doi: 10.1016/j.mehy.2017.06.001.

MARCOBAL, A. et al. A metabolomic view of how the human gut microbiota impacts the host metabolome using humanized and gnotobiotic mice. **The ISME journal** vol. 7,10 (2013): 1933-43.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet: The Global Bioinformatics Network** [S.l.], v. 17, n. 1, p. pp. 10-12, may 2011

MEDEIROS, C. I. S.; COSTA, T. P. Repercussão da microbiota intestinal na modulação do sistema nervoso central e sua relação com doenças neurológicas. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 19, n. 2, p. 342-346, 2020.

MEDEL-MATUS JS, et al. Facilitation of kindling epileptogenesis by chronic stress may be mediated by intestinal microbiome. **Epilepsia Open**. 2018;3(2):290-294. Published 2018 Apr 9. doi:10.1002/epi4.12114.

MELO, I. S., et al., 2016. Inhibition of sodium glucose cotransporters following status epilepticus induced by intrahippocampal pilocarpine affects neurodegeneration process in hippocampus. **Epilepsy Behav.** 61:258-268.

MENGONI, F., et al. Gut microbiota modulates seizure susceptibility. **Epilepsia**, v. 62, n. 9, p. e153-e157, 2021.

MENNI C, et al. Circulating levels of the anti-oxidant indolepropionic acid are associated with higher gut microbiome diversity. **Gut Microbes.** 2019;10(6):688-695. doi: 10.1080/19490976.2019.1586038.

MESDAGHINIA, A., et al. Anticonvulsant effects of thiamine on pentylenetetrazole-induced seizure in mice. **Nutr Neurosci.** 2019. 22(3):165-173.

METWALY, A., et al., 2020. Integrated microbiota and metabolite profiles link Crohn's disease to sulfur metabolism. **Nat Commun.** 11(1):4322.

MOSHÉ, S. L. et al. Epilepsy: New advances. **The Lancet**, v. 385, n. 9971, p. 884–898, 2015.

MURGIA, F. et al. "Metabolomics As a Tool for the Characterization of Drug-Resistant Epilepsy." **Frontiers in neurology** vol. 8 459. 2017

NIRWAN, N., VYAS, P., VOHORA, D., 2018. Animal models of status epilepticus and temporal lobe epilepsy: A narrative review. **Rev Neurosci.** 9(7):757-770.

NUNES, A. J. G.; BERTOLIN, D. C. "MICROBIOTA INTESTINAL: REVISÃO INTEGRATIVA DA LITERATURA." *Revista Corpus Hippocraticum* 2.1 (2021)

OBERC A, COOMBES BK. Convergence of External Crohn's Disease Risk Factors on Intestinal Bacteria. **Front Immunol.** 2015 Nov 3;6:558. doi: 10.3389/fimmu.2015.00558.

OLSON C.A. et al. The Gut Microbiota Mediates the Anti-Seizure Effects of the Ketogenic Diet. **Cell.** 2018 Jun 14;173(7):1728–1741.

PAIXÃO, L. A.; CASTRO, F. F. S. Colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 14, n. 1, p. 85-96, 2016.

- PATI S., ALEXOPOULOS A.V. Pharmacoresistant epilepsy: From pathogenesis to current and emerging therapies. **Cleve. Clin. J. Med.** 2010;**77**:457–467.
- PEIRCE JM, ALVIÑA K. The role of inflammation and the gut microbiome in depression and anxiety. **J Neurosci Res.** 2019 Oct;**97**(10):1223-1241. doi: 10.1002/jnr.24476.
- PENG A., et al. Altered composition of the gut microbiome in patients with drug-resistant epilepsy. **Epilepsy Research.** 2018 Nov;**147**:102–107.
- PIETRUCCHI, D. et al. Dysbiosis of gut microbiota in a selected population of Parkinson's patients. **Parkinsonism & related disorders** vol. 65, p. 124-130. 2019.
- PIMENTA, G. M. B. **Sono e epilepsia: estudo da arquitetura do ciclo vigília-sono em animais do modelo experimental de epilepsia do lobo temporal por pilocarpina. Análise qualitativa e quantitativa.** Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de medicina. Universidade de São Paulo, São Paulo 2009.
- PITKÄNEN, A., SUTULA, T. P., 2002. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. **Lancet Neurol.** 1(3):173-81.
- PORTO, L. A., et al. O papel dos canais iônicos nas epilepsias e considerações sobre as drogas antiepilépticas: uma breve revisão. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology** v.13.4, p.169-175. 2007.
- QIU, X. et al. “Characterization of fungal and bacterial dysbiosis in young adult Chinese patients with Crohn's disease.” **Therapeutic advances in gastroenterology.** vol. 13 1756284820971202. 12 Nov. 2020, doi:10.1177/1756284820971202.
- RAO, J., et al., 2021a. Fecal microbiota transplantation ameliorates gut microbiota imbalance and intestinal barrier damage in rats with stress-induced depressive-like behavior. **Eur J Neurosci.** 53(11):3598-3611.
- ROMANO, S., et al., 2021. Meta-analysis of the Parkinson's disease gut microbiome suggests alterations linked to intestinal inflammation. **NPJ Parkinsons Dis.** 7(1):27.
- ŞAFAK B., et al. The gut microbiome in epilepsy. **Microbial Pathogenesis.** 2019.

SANTOS, E. M. dos; ARAUJO, R.R. Testes de comparação de protocolos de extração de DNA e de maceração de tecido de *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae). **Rev. Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 15, n.4, p. 199-202, 2017

SCHENKEL L.C; et al. Serotonin transporter gene (5HTT) polymorphisms and temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research**. 2011.

SCHÖNFELD P, REISER G. Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain. **J Cereb Blood Flow Metab**. 2013 Oct;33(10):1493-9. doi: 10.1038/jcbfm.2013.128.

SIMONATO, M., et al., 2021. Identification of clinically relevant biomarkers of epileptogenesis — a strategic roadmap. **Nat Rev Neurol**. 17(4):231-242.

SOCHOCKA, M., et al., 2019. The Gut Microbiome Alterations and Inflammation-Driven Pathogenesis of Alzheimer's Disease—a Critical Review. **Mol Neurobiol**. 56(3):1841-1851.

STRANDWITZ, P. (2018). Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. **Brain Res**. 1693(Pt B):128-133.

SUN MF, SHEN YQ. Dysbiosis of gut microbiota and microbial metabolites in Parkinson's Disease. **Ageing Res Rev**. 2018 Aug;45:53-61. doi: 10.1016/j.arr.2018.04.004.

TAHMASEBI, S., et al., 2020. Probiotics and *Nigella sativa* extract supplementation improved behavioral and electrophysiological effects of PTZ-induced chemical kindling in rats. **Epilepsy Behav**. 104(Pt A):106897.

TAKADA T, et al. Fusicatenibacter saccharivorans gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces. **Int J Syst Evol Microbiol**. 2013 Oct;63(Pt 10):3691-3696.

TAKESHITA, K., et al., 2016. Single Species of *Clostridium* Subcluster XIVa Decreased in Ulcerative Colitis Patients. **Inflamm Bowel Dis**. 22(12):2802-2810.

THURMAN, D. J. Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. **Epilepsia**. p. 2-26. 2011.

- VACCA, M. et al. The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. **Microorganisms** vol. 8,4 573. 2020.
- VAILLEND, C., et al., 2002. Mechanisms of neuronal hyperexcitability caused by partial inhibition of Na⁺-K⁺-ATPases in the rat CA1 hippocampal region. **J Neurophysiol.** 88(6):2963-78.
- VALENÇA, L. P. A. A.; VALENÇA, M. M.; VELASCO, T. R.; LEITE, J. P. **Epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal.** *Epilepsy Clin Neurophysiol* 2006; 12(1):31-36
- VALLI, L. G.. Mecanismo de ação do glutamato no sistema nervoso central e a relação com doenças neurodegenerativas. **Revista Brasileira de neurologia e Psiquiatria**, v. 18, n. 1, 2014.
- VAN DEN BRULE, S., et al., 2021. Diesel exhaust particles alter the profile and function of the gut microbiota upon subchronic oral administration in mice. **Part Fibre Toxicol.** 18(1):7.
- VAN OLST, L., et al., 2021. Contribution of Gut Microbiota to Immunological Changes in Alzheimer's Disease. **Front Immunol.** 12:683068.
- VENTURIN, G. T. **Efeito do transplante de células mononucleares da medula óssea na frequência de crises e no desenvolvimento cognitivo de ratos com epilepsia induzida por lítio-pilocarpina.** Dissertação (Mestrado em Neurociências) Instituto de Ciências básicas da saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008.
- VERHOOG, Q. P., et al., 2020. Astrocytes as Guardians of Neuronal Excitability: Mechanisms Underlying Epileptogenesis. **Front Neurol.** 11:591690.
- VIEIRA, D. E. et al. Efeitos benéficos do exercício físico nas epilepsias: o judô faz parte deste contexto?. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology** [online]. 2007, v. 13, n. 3, pp. 131-136. <https://doi.org/10.1590/S1676-26492007000300008>.
- WANG H. X, WANG Y. P. Gut Microbiota-brain Axis. *Chinese Medical Journal* 2016; 129 (19): 2373-2380.

WEIS, S., et al. Effect of Parkinson's disease and related medications on the composition of the fecal bacterial microbiota. **npj Parkinsons Dis.** **5**, 28 (2019).

WEN, L, DUFFY, A. Factors Influencing the Gut Microbiota, Inflammation, and Type 2 Diabetes. **J Nutr.** 2017 Jul;147(7):1468S-1475S.

WIESER, H-G. **Mesial temporal Lobe Epilepsy with Hippocampal Sclerosis.** *Epilepsia*, p. 695-714, 2004. International League Against Epilepsy.

WIKOFF, W. R et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** vol. 106,10 (2009): 3698-703.

WISHART, D.S, et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. **Nucleic Acids Res.** 2018.

WU, J. et al. Intestinal Microbiota as an Alternative Therapeutic Target for Epilepsy. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology.** vol. 2016 p. 1-6, 2016.

YACUBIAN, E. M. T.; KOCHEN, S. **Crises epilépticas.** –Leitura Médica Ltda. São Paulo. 2014.

YARANDI, S. S. et al. Modulatory Effects of Gut Microbiota on the Central Nervous System: How Gut Could Play a Role in Neuropsychiatric Health and Diseases. **Journal of Neurogastroenterology and Motility.** vol. 22 p. 201-212. 2016.

YARANDI, S. S. et al. Modulatory Effects of Gut Microbiota on the Central Nervous System: How Gut Could Play a Role in Neuropsychiatric Health and Diseases. **Journal of Neurogastroenterology and Motility.** vol. 22 p. 201-212. 2016.

YEOM, J. S., et al., 2019. Neonatal seizures and white matter injury: Role of rotavirus infection and probiotics. **Brain Dev.** 41(1):19-28.

ZALAR B, HASLBERGER A, PETERLIN B. The Role of Microbiota in Depression - a brief review. **Psychiatr Danub.** 2018 Jun;30(2):136-141. doi: 10.24869/psyd.2018.136.

ZHANG Y., et al. Altered gut microbiome composition in children with refractory epilepsy after ketogenic diet. **Epilepsy Research**. 2018 Jun 28;145:163–168.

ZHENG, Y., ET al., 2021. The gut-brain axis in autism spectrum disorder: A focus on the metalloproteases adam10 and adam17. **Int J Mol Sci**. 22(1):118

ZHOU, Y., DANBOLT, N. C., 2014. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. **J Neural Transm** (Vienna). 121(8):799-817

ZORZO, R. A. Impacto do microbioma intestinal no eixo cérebro-intestino. **International Journal of Nutrology**, v. 10, n. 01, p. 298-305, 2017.

ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação comitê de ética animal



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “*Caracterização da microbiota intestinal nas diferentes fases de epileptogênese*”, registrada com o nº 13 /2019, sob a responsabilidade do pesquisador **Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitaí**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), **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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 23 de agosto de 2018.

Vigência da autorização	09.09.2019 a 09.07.2021
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	70
Peso/idade	60 dias
Sexo	Machos
Origem/Local de manutenção	Biotério Central da Ufal / Biotério Setorial da Faculdade de Nutrição – Fanut-Ufal
Colaboradores	Wanessa S. Pereira, Erivaldo D. S. Júnior, Pedro A. T. Paulino, Maria Jordana C. Santos, Dhennyfer L. S. Silva, Jéssica G. S. Alves e Maria Eduarda Tenório

Maceió, 02 de setembro de 2019.

Elyan Nascimento dos Santos Filho

Coordenador da CEUA

SIAPE 1756479