

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

Brenda Santos Fraga

**Efeito da dieta hiperlipídica e da
suplementação com probiótico na
expressão gênica no bulbo olfatório
e na memória de camundongos
machos adultos**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

Porto Alegre

2023

Brenda Santos Fraga

**Efeito da dieta hiperlipídica e da
suplementação com probiótico na
expressão gênica no bulbo olfatório
e na memória de camundongos
machos adultos**

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Biociências
da Fundação Universidade Federal
de Ciências da Saúde de Porto
Alegre como requisito para a
obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Dra Márcia Giovenardi
Coorientadora: Dra Vanessa Feistauer

Porto Alegre

2023

Catálogo na Publicação

Fraga, Brenda Santos

Efeito da dieta hiperlipídica e da suplementação com probiótico na expressão gênica no bulbo olfatório e na memória de camundongos machos adultos / Brenda Santos Fraga. -- 2023.

67 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2023.

Orientador(a): Márcia Giovenardi ; coorientador(a): Vanessa Feistauer.

1. Dieta hiperlipídica. 2. Lacticaseibacillus rhamnosus. 3. Bulbo olfatório. 4. Neuroinflamação. 5. Homeostase energética. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), e contou com recursos financeiros da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da UFCSPA.

Dedico este trabalho ao meu eterno amor e companheiro, Nicolas. Que esteve comigo durante todo processo, me encorajando e incentivando.
A todos os animais que têm sua vida destinada à Ciência.

AGRADECIMENTOS

Não posso começar sem mencionar em primeira mão, minha querida e atenciosa professora orientadora Márcia Giovenardi, sem sua generosidade e empatia esta jornada não teria acontecido. Obrigada por me mostrar como uma professora deve seguir a docência e também como tratar seus alunos.

Aos meus pais, minha eterna gratidão por tudo que fizeram para que eu pudesse estudar e seguir meu sonho, sei que não foi fácil. Eu os amo com todo meu coração.

A minha irmã, Eduarda, que mesmo tão jovem e sem saber, me incentivou a ser um belo exemplo para seus olhos.

A minha co-orientadora Vanessa Feistauer, meu carinho especial por sempre ter se colocado à disposição e me ajudado tirando cada dúvida que surgiu ao longo do caminho.

A minha essencial colega Patrícia Molz, que não poupou esforços para estar ao meu lado me ajudando com tudo e ainda, por servir de ombro amigo nas horas de desânimo. Sei que serás uma grande professora.

Ao meu grande amor, mais uma vez, meu mais profundo agradecimento por estar tão presente e dividir a vida comigo. Sem ti eu não teria chegado tão longe, eu te amo.

LISTA DE ABREVIATURAS

BO: bulbo olfatório

OSNs: neurônios sensoriais olfativos (do inglês, *olfactory sensory neurons*)

EO: epitélio olfativo

BOP: bulbo olfatório principal

BOA: bulbo olfatório acessório

OVN: órgão vomeronasal

AMe: amígdala medial

SNC: sistema nervoso central

IN: insulina

HFD: dieta hiperlipídica (do inglês, *high-fat diet*)

IL-1: interleucina 1

IL-6: interleucina 6

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *tumor necrosis factor- α*)

LPS: lipossacarídeo

FAO: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (do inglês, *Food and Agriculture Organization of the United States Nations*)

WHO: Organização Mundial da Saúde (do inglês, *World Health Organization*)

BAL: bactérias ácido lácticas

IL-1 β : interleucina 1beta

MCP-1: proteína quimioatraente de monócitos-1 (do inglês, *monocyte chemoattractant protein-1*)

Drd2: receptor D2 de dopamina

Th: tirosina hidroxilase

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*)

Sirt1: sirtuina 1

Prlr: receptor de prolactina

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Desenho esquemático que mostra os circuitos olfativos de camundongos.....	13
Figura 02: Desenho esquemático mostrando as conexões do BOA (esquerda) e do BOP (direita) do sistema olfativo de camundongo.....	14

RESUMO

Nos mamíferos, o olfato afeta diretamente o consumo e a frequência de ingestão dos alimentos, uma vez que contribui para a avaliação hedônica dos alimentos. O bulbo olfatório (BO) é a estrutura cortical responsável pelo processamento de sinais químicos que entram na cavidade nasal e devido a suas projeções para o sistema límbico, possui papel importante nas funções fisiológicas, incluindo reprodução, comportamento social, localização e seleção de alimentos, além de regular funções neuroendócrinas. A suplementação com probióticos vêm sendo investigada pela sua potencial ação na redução de mediadores inflamatórios. Nosso objetivo foi avaliar a expressão de genes relacionados com o sistema dopaminérgico, neuroinflamação e a homeostase energética no BO, bem como parâmetros bioquímicos no soro e a memória de longa duração em machos alimentados com dieta hiperlipídica e suplementação de probióticos por 16 semanas. Foram utilizadas amostras de camundongos machos (n=36) da linhagem C57BL/6J provenientes do projeto “Análise de intervenções na dieta e suplementação com probiótico, em diferentes fases do desenvolvimento, através da avaliação de parâmetros comportamentais, bioquímicos, imunológicos e genéticos” (CEUA número 722/21), mantidos no biotério da UFCSPA. Machos com 21 dias de idade foram divididos em 4 grupos: controle (CONT, recebeu dieta padrão de biotério), controle + probiótico (CONT+PROB), hiperlipídica (HFD) e hiperlipídica + probiótico (HFD+PROB), todos com livre acesso à água. Utilizou-se uma nova preparação probiótica composta por *Lactocaseibacillus rhamnosus* LB1.5 que contém contagens viáveis de $1,3 \times 10^8$ ufc/mL, e que foi administrada 3 vezes na semana por gavagem. Aos 5 meses de idade foi realizado o teste de reconhecimento de objetos (ORT). Após o teste comportamental, os animais foram anestesiados e eutanasiados para coleta do material biológico. O BO foi coletado e avaliou-se a expressão gênica relativa dos seguintes genes: receptor da dopamina (*Drd2*), tirosina hidroxilase (*Th*), fator neurotrófico derivado do cérebro (*Bdnf*), sirtuína 1 (*Sirt1*) e receptor de prolactina (*Prlr*). No soro foi quantificada a concentração de glicose e triglicerídeos. Não houve diferença significativa na memória de longa duração, mensurada pelo ORT, entre os 4 grupos estudados ($p > 0,05$). Em relação a expressão gênica, a expressão do *Drd2* apresentou um efeito do probiótico, mas nenhuma diferença estatística no ps teste. Entretanto,

analisamos o gene *Th* e encontramos interação entre os fatores, dieta e tratamento e efeito do probiótico. No teste de *post hoc*, verificamos que a expressão gênica relativa de *Th* era mais baixa no grupo HFD+PROB quando comparado ao grupo HFD ($p < 0.05$). Na análise da expressão gênica de *Sirt1*, a ANOVA de duas vias mostrou interação entre os fatores, dieta e tratamento, onde a expressão de *Sirt1* diminuiu significativamente no grupo HFD e no grupo CONT+PROB ($p < 0.01$). Não encontramos diferenças na expressão gênica de *Prlr* e *Bdnf*, nem nos parâmetros bioquímicos analisados. Como conclusão, a dieta rica em gordura e suplementação probiótica utilizadas durante 16 semanas não alteram a memória de longo prazo, mas modulam a expressão gênica no bulbo olfatório de camundongos machos adultos.

PALAVRAS-CHAVE: *Lactobacillus rhamnosus* LB1.5, sirtuina1, sistema dopaminérgico, receptor de prolactina, fator neurotrófico derivado do cérebro, homeostase energética.

ABSTRACT

In mammals, smell directly affects the consumption and frequency of food intake, as it contributes to the hedonic evaluation of food. The olfactory bulb (OB) is the cortical structure responsible for processing chemical signals entering the nasal cavity, and due to its projections to the limbic system, it plays an important role in physiological functions, including reproduction, social behavior, location and food selection, in addition to regulating neuroendocrine functions. Supplementation with probiotics has been investigated with potential action in the reduction of inflammatory mediators. Our objective was to evaluate the expression of genes related to the dopaminergic system, neuroinflammation and energy homeostasis in OB, as well as biochemical parameters in serum and long-term memory in males fed a high-fat diet and probiotic supplementation for 16 weeks. Samples of male mice (N=36) of the C57BL/6J lineage from the project "Analysis of interventions in the diet and supplementation with probiotics, at different stages of development, through the evaluation of behavioral, biochemical, immunological and genetic parameters" (CEUA number 722/21), kept in the UFCSPA vivarium. 21-day-old males were divided into 4 groups: control (CONT, received standard vivarium diet), control + probiotic (CONT+PROB), high-fat (HFD) and high-fat + probiotic (HFD+PROB), all with free access the water. A new probiotic preparation composed of *Lactocaseibacillus rhamnosus* LB1.5 which contains viable counts of 1.3×10^8 cfu/mL, and which was administered 3 times a week by gavage. At 5 months of age, the object recognition test (ORT) was performed. After the behavioral test, the animals were anesthetized and euthanized for the collection of biological material. OB was collected and the relative gene expression of the following genes was evaluated: dopamine receptor (*Drd2*), tyrosine hydroxylase (*Th*), brain-derived neurotrophic factor (*Bdnf*), sirtuin 1 (*Sirt1*) and prolactin receptor (*Prlr*). In the serum, the serum concentration of glucose and triglycerides was quantified. There was no significant difference in long-term memory, measured by ORT, between the 4 studied groups ($p > 0.05$). Regarding gene expression, *Drd2* expression showed an effect of the probiotic, but no statistical difference from the post hoc test. However, we analyzed the *Th* gene and found interaction between the factors, diet and treatment, and the effect of the probiotic. In the post hoc test, we found that the relative *Th* gene expression was lower in the HFD+PROB group when compared to the HFD group ($p < 0.05$). In the analysis of

Sirt1 gene expression, two-way ANOVA showed interaction between factors, diet and treatment, where *Sirt1* expression decreased significantly in the HFD group and in the CONT+PROB group ($p < 0.01$). We did not find differences in the gene expression of *Prlr* and *Bdnf*, nor biochemical parameters analyzed. In conclusion, a high-fat diet and probiotic supplementation used for 16 weeks did not alter long-term memory, but modulated gene expression in the olfactory bulb of adult male mice.

KEYWORDS: *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB1.5, sirtuin1, dopaminergic system, prolactin receptor, brain-derived neurotrophic factor, energy homeostasis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Sistema olfatório	12
1.1.1 Neuroquímica do sistema olfatório	16
1.2 Dieta hiperlipídica	17
1.3 Probióticos	19
2. JUSTIFICATIVA	21
3. HIPÓTESE	22
4. OBJETIVOS	23
4.1 Objetivo Geral	23
4.2 Objetivos Específicos	23
5. ARTIGO CIENTÍFICO	24
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	60
CURRÍCULO LATTES	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistema olfatório

Em mamíferos, o sistema olfatório pode discriminar milhares de estímulos químicos. Este sistema é discutido por vários autores devido a sua importância em diversos aspectos anatômicos, fisiológicos e comportamentais (WHITTEN; CHAMPLIN, 1959).

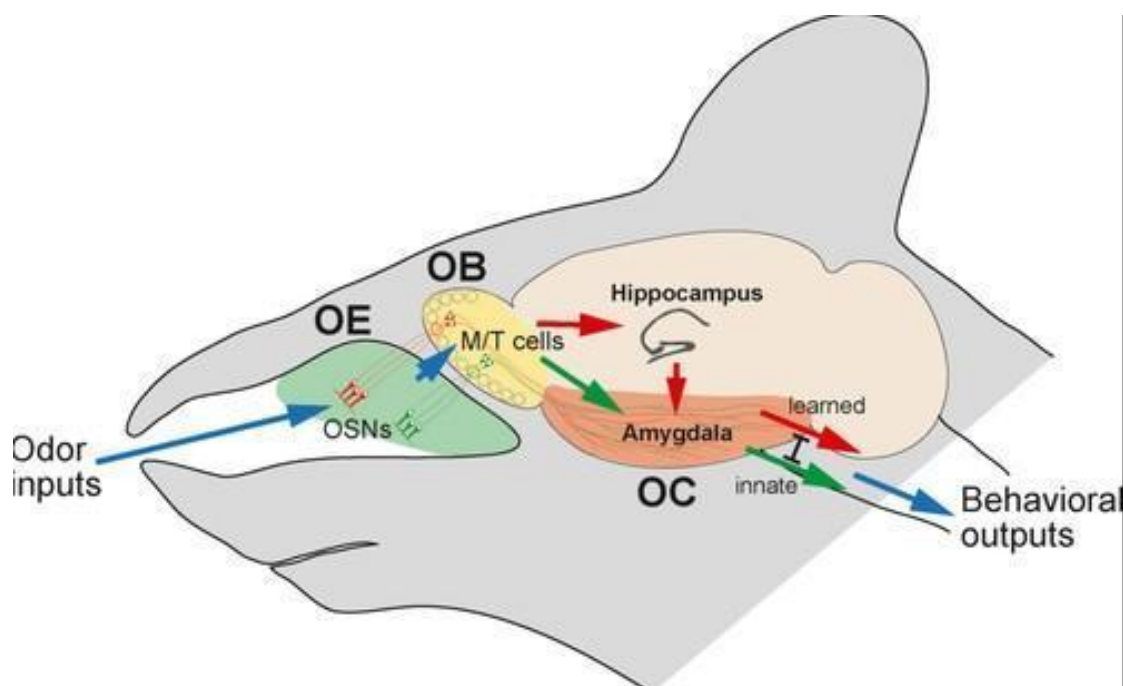
A regulação do metabolismo é fundamental para que um organismo possa responder de modo rápido e eficiente a variações das condições ambientais, alimentares ou ainda, a condições adversas como traumas e doenças. Esta regulação visa manter constante um conjunto de condições dentro das células, uma condição chamada homeostase. A regulação metabólica é extremamente complexa, envolvendo vias, órgãos e hormônios, os quais promovem ativação ou inibição de reações químicas específicas para cada situação resultando em respostas biológicas adequadas (RIERA *et al.*, 2017).

Neste contexto, o olfato afeta diretamente o consumo e a frequência da ingestão dos alimentos pelos roedores, assim como em outros animais (LOCH; BREER; STROTMANN, 2015). A ingestão alimentar depende da interação entre a regulação homeostática e as sensações hedônicas, ou seja, sensações de satisfação e prazer. A olfação é um dos sistemas sensoriais que contribui para a avaliação hedônica dos alimentos, que por sua vez influencia as escolhas e o consumo alimentar (PALOUZIER-PAULIGNAN *et al.*, 2012).

O bulbo olfatório (BO) é uma estrutura cortical do sistema nervoso central responsável (SNC) pelo processamento de sinais químicos (moléculas odoríferas) que entram em contato com a cavidade nasal (SHIPLEY; ENNIS; PUCHE, 2003). Além disso, devido a suas conexões com estruturas do sistema límbico, como mostra a figura 01, possui papel importante nas funções fisiológicas, incluindo reprodução, comportamento social e comunicação, localização e seleção de alimentos, comportamento materno, além de regular funções neuroendócrinas (SHIPLEY; ENNIS; PUCHE, 2003). O BO desempenha um papel importante na plasticidade olfativa. Os astrócitos são consideravelmente importantes nessa estrutura, garantindo a transmissão do sinal dos neurônios sensoriais olfativos

(OSNs) para as áreas centrais (DAUMAS-MEYER *et al.*, 2018). A atividade dos OSNs no epitélio olfativo (EO) é modulada por moléculas associadas ao metabolismo, como por exemplo a insulina, indicando que os OSNs podem sim ser afetados por mudanças na dieta (WHALLEY, K., 2014).

Figura 01:



Desenho esquemático que mostra os circuitos olfativos de camundongos. Os odorantes são detectados por moléculas expressas em OSNs dentro do OE. Sinais de ligação de odores são convertidos em um mapa topográfico de glomérulos ativado no OB. As informações de odor são então transmitidas por células mitrais/tufadas para várias regiões para reconhecimento de odor e tomada de decisão (SAKANO, 2020). Abreviações: OE epitélio olfativo; OSNs neurônios sensoriais olfativos; OB bulbo olfatório; M/T cells células mitrais e tufoas; OC córtex olfatório.

Em roedores, a olfação se difere em concordância com a anatomia em duas vias, de acordo com a natureza da informação processada, como observado na figura 02. Uma delas é o bulbo olfatório principal (BOP) que é responsável por distinguir uma gama de odores encontrados no ambiente e relacionar esses odores com vários tipos de comportamentos. Axônios dos neurônios do BOP, principalmente células mitrais, viajam no trato olfativo para entrar na base do cérebro, onde distribuem os sinais olfativos para um ou mais dos centros olfativos corticais, ou seja, o córtex piriforme, o córtex parahipocampal anterior (córtex entorrinal) e a

Desenho esquemático que mostra as conexões do BOA (esquerda) e do BOP (direita) do sistema olfativo de camundongos. O sombreado claro mostra áreas que recebem entrada direta do BOP, já o sombreado escuro mostra áreas que recebem entrada direta do BOA. Na amígdala as áreas sombreadas claras indicam a amígdala olfativa e as áreas sombreadas escuras indicam a amígdala vomeronasal (BAUM, 2010). Abreviações: VNO órgão vomeronasal; AOB bulbo olfatório acessório; MeA amígdala medial; MePD amígdala medial pósterodorsal; PMCo amígdala cortical posteromedial; ACo amígdala cortical anterior; PLCo amígdala cortical posterolateral; BNST núcleo da estria terminal – lateral (L) e medial (M); mPOA área pré-óptica medial; VMH núcleo hipotalâmico ventromedial; VTA área tegmental ventral; Acb núcleo accumbens; MOE epitélio olfatório principal; MOB bulbo olfatório principal; AON núcleo olfatório anterior; OT trato olfatório; Pir córtex piriforme; Ent córtex entorrinal.

Em virtude disso, o sistema olfatório é capaz de processar informações de dois estímulos: os feromônios, captados pelo órgão vomeronasal (OVN) e os estímulos químicos do ar captados pelo EO, os dois localizados na cavidade nasal. Os receptores do OVN se projetam para o BOA, situado na região dorsocaudal do BOP. Esses sinais são processados no BO e são projetados para várias áreas envolvidas na percepção, como a amígdala e o hipotálamo (SÁNCHEZ-ANDRADE; JAMES; KENDRICK, 2005). O BOP, que capta uma gama bastante variada de odores, recebe aferências do EO e envia suas eferências para a amígdala medial (AMe) (BAUM, 2010).

A percepção olfatória acontece nos neurônios sensoriais presentes no EO que se projetam até o BOP (tem sua organização laminar, dividida em camadas de acordo com o tipo celular principal). A projeção dos neurônios sensoriais é feita pelo nervo olfatório, que encaminha milhares de axônios do EO até a camada glomerular, onde começa a integração sináptica do BO. Animais em jejum apresentam maior sensibilidade e exibem maior tempo de exploração de odores alimentares do que aqueles já saciados (AIMÉ *et al.*, 2007; PRUD'HOMME *et al.*, 2009). Baseado nisso os hormônios orexígenos e anorexígenos conhecidos por agirem nos receptores localizados no sistema olfativo, são candidatos cotados para modulações a respeito da alimentação e saciedade (PALOUZIER-PAULIGNAN *et al.*, 2012).

A olfação modula a ingestão através da localização e da diferenciação das fontes de alimentos. Dada a relação entre o processamento olfativo e a ingestão de alimentos, espera-se que mudanças no estado nutricional modifiquem as reações aos odores. Consistente com isso, a sensibilidade olfativa é aprimorada pelo jejum e

reduzida pela alimentação tanto em roedores quanto em seres humanos (AIMÉ *et al.*, 2007).

Roedores que passam pelo procedimento de ablação do BO tornam-se resistentes ao desenvolvimento da obesidade induzida por dieta e, ainda, apresentam aumento da termogênese no tecido adiposo marrom e nos depósitos inguinais. A percepção olfativa diminuída estimula o sistema nervoso simpático, resultando na ativação de receptores β -adrenérgicos em adipócitos brancos e marrons, promovendo lipólise (RIERA *et al.*, 2017).

1.1.1 Neuroquímica do sistema olfatório

Diversos neurotransmissores participam da neuroquímica do sistema olfatório e, como consequência, estão envolvidos na modulação dos estímulos odoríferos (HALÁSZ; SHEPHERD, 1983). Estudos no BO de camundongo indicam que quase todos os interneurônios expressam o fenótipo GABAérgico (KIYOKAGE *et al.*, 2010; PANZANELLI *et al.*, 2007; PARRISH-AUNGST *et al.*, 2007). Um subconjunto de interneurônios periglomerulares coexpressa dopamina, enquanto outros subconjuntos são caracterizados pela coexpressão de peptídeos neuroativos ou proteínas de ligação ao cálcio (KOSAKA *et al.*, 1998; PARRISH-AUNGST *et al.*, 2007; TOIDA, 2008). Estudo prévio (HSIA *et al.*, 1999) mostrou que a ativação do receptor D2 da dopamina promove diminuição significativa na transmissão sináptica entre neurônios olfativos e células mitrais. Além disso, a dopamina liberada no BOP aumenta a atividade sináptica dessas células. Também, no BOP a serotonina é liberada por neurônios originados nos núcleos da rafe. A entrada serotoninérgica do núcleo da rafe para o bulbo olfatório principal tem como alvo a camada glomerular, onde a serotonina atua nas células periglomerulares para aumentar a inibição das células mitrais e em tufos (PETZOLD; HAGIWARA; MURTHY, 2009).

Além de neurotransmissores, neuropeptídeos participam da neuroquímica do BO, dentre eles podemos citar: grelina, leptina e insulina.

A grelina é um hormônio orexígeno sintetizado principalmente pelo sistema gastrointestinal e, em menores quantidades, pelo SNC, rins, placenta e coração (KOJIMA *et al.*, 1999). Nos seres humanos, a grelina induz a fome, estimula a ingestão de alimentos e aumenta o prazer das refeições (DRUCE *et al.*, 2005). Sua

ação nos neurônios olfatórios é aumentar a capacidade de resposta frente a odorantes com características estruturais distintas (LOCH; BREER; STROTMANN, 2015).

Outro importante hormônio é a leptina, hormônio anorexígeno sintetizado basicamente pelos adipócitos, em menores quantidades pela placenta, mucosa gástrica, músculo esquelético (NEGRÃO; LICINIO, 2000), córtex, cerebelo, hipófise, hipotálamo e BO (MORASH *et al.*, 2014). No hipotálamo ela promove a redução do consumo alimentar e o aumento do gasto energético, além de regular a função neuroendócrina e o metabolismo da glicose e das gorduras (TRAYHURN; BING, 2006). O efeito da leptina no desempenho olfativo é anatomicamente reforçado pelo fato de que, junto do hipotálamo, o sistema olfativo é também um dos seus principais alvos, devido aos seus receptores serem altamente expressos no córtex piriforme no BO (JULLIARD *et al.*, 2007). Similar à insulina, a leptina é capaz de modular o comportamento olfativo, assim como o disparo neural (JULLIARD *et al.*, 2007).

A insulina (IN), hormônio anabólico, é liberada pelas células beta pancreáticas em resposta ao estado alimentado, de maneira que se torna dependente da glicose (HENQUIN, 2011). A síntese de IN no SNC foi apontada em estruturas como o hipocampo e BO, sugerindo que possa exercer funções relacionadas à memória e ao comportamento alimentar (DEVASKAR *et al.*, 1994). O BO é a região do cérebro com a maior concentração de IN (BASKIN *et al.*, 1983), bem como a maior densidade de receptores de IN (HILL *et al.*, 1986).

1.2 Dieta hiperlipídica

A dieta hiperlipídica (HFD) é caracterizada por sua principal fonte de energia ser proveniente de gorduras e é um modelo bastante comum de dieta consumida atualmente, conhecida também como dieta ocidental (CORDNER; TAMASHIRO, 2015). No entanto, este tipo de dieta acarreta importantes prejuízos na qualidade de vida de quem a consome, por estar relacionada à hiperlipidemia, resistência à insulina, hipertensão, aterosclerose, diabetes, obesidade, síndrome metabólica e depressão (LABORDE; SÁEZ-SANTIAGO, 2013; GOODPASTER *et al.*, 2005; FORD, 2004; STUNKARD *et al.*, 2003). Justamente, pela HFD induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, TNF- α , no fígado, tecido adiposo e

músculo, ela causa um quadro de inflamação de baixo grau (WEISBERG *et al.*, 2003; CAI *et al.*, 2005).

Uma dieta desequilibrada, como a HFD que possui altos níveis de gordura tem sido associada à diminuição da motilidade intestinal, prejudicando o funcionamento das junções oclusivas, promovendo aumento da permeabilidade intestinal. Isso pode representar um problema expressivo visto que, a permeabilidade intestinal é controlada com rigor para garantir que os mecanismos de defesa funcionem perfeitamente e junto disso ocorra a absorção dos nutrientes necessários para a manutenção na homeostase (KIM *et al.*, 2012; CANI *et al.*, 2008). Os malefícios do consumo da HFD a longo prazo podem ir ainda mais longe, chegando ao SNC e causando neuroinflamação (MILLER; SPENCER, 2014; ALMEIDA-SUHETT *et al.*, 2017).

Além do mais a HFD já demonstrou aumentar os níveis séricos de lipopolissacarídeo (LPS), causando endotoxemia, o que mais uma vez estimula a produção das citocinas pró-inflamatórias (AGGARWAL; SWAMI; KUMAR, 2013). Chompre *et al.*, 2022 mostraram que ratos alimentados com HFD durante apenas 30 dias já demonstraram desespero comportamental (que é quando o animal passa mais tempo durante o teste de natação forçada, fazendo apenas movimentos para manter a cabeça fora d'água, desistindo de tentar escapar), alteração na abundância bacteriana, aumento dos níveis séricos de leptina e ácidos graxos livres, mesmo sem ganho de peso excessivo, e obesidade presentes. Achados significantes para entendermos que os prejuízos causados pela HFD não estão apenas condicionados a animais e indivíduos obesos ou que a consomem por longos períodos de tempo.

Fadool; Tucker; Pedarzani (2011) demonstraram que uma dieta com 32% de gordura reduz o número de OSNs, da mesma forma que eleva a concentração sérica de insulina e glicose, o que altera diretamente as propriedades biofísicas das células mitrales do BO, podendo contribuir para o desequilíbrio energético.

Diretamente relacionadas com nosso tecido de estudo, as dietas ricas em gordura, independente do grau de adiposidade, podem afetar a arquitetura neural do sistema olfativo, tendo como consequência a lenta aprendizagem olfatória, além de apresentar uma redução na discriminação olfativa (THIEBAUD *et al.*, 2014).

Não só independente do grau de adiposidade, mas também independente do período da vida em que o animal consome as dietas ricas em gorduras é possível observar os prejuízos causados por elas. Palazzo *et al.*, 2020, mostraram que ratos Wistar expostos à dieta durante as fases gestacional e lactacional tiveram os níveis de *Bdnf* reduzidos no BO.

1.3 Probióticos

Segundo a *Food and Agriculture Organization of the United States Nations* (FOA) e a *World Health Organization* (WHO) probióticos são definidos como: “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”. Devido ao aumento dos estudos e achados sobre a temática, ambas instituições (FOA e WHO) elaboraram no início dos anos 2000 um documento intitulado “Probiotics in food, health and nutritional properties and guidelines for evaluation”, concentrando informações relevantes e servindo como uma guia para futuros estudos.

Probióticos são microrganismos vivos, entretanto não é todo microrganismo vivo que pode ser considerado um probiótico. Faz-se necessário uma série de testes *in vitro* para que haja a validação de uma cepa probiótica, tais como: resistência à acidez gástrica, resistência aos sais biliares, aderência ao muco, atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas e capacidade de reduzir a adesão de patógenos a superfícies (FAO/WHO, 2006).

A suplementação com probióticos está sendo utilizada e aponta alguns benefícios, como diminuição do colesterol, regulação imunológica, digestiva e respiratória, além de importante papel sobre doenças infecciosas e também sobre a obesidade (KHARE; GAUR, 2020; FOA/WHO, 2006). Estudo prévio de Yoo e colaboradores (2013) com camundongos C57BL/6 machos alimentados com HFD durante 9 semanas e que receberam *Lactobacillus curvatus* HY7601 em combinação com *Lactobacillus plantarum* KY1032 apresentaram redução no ganho de peso corporal e ainda, redução no peso do tecido adiposo. Da mesma forma, estudo realizado por Alipour e colaboradores (2021) verificou que a suplementação com *Lactobacillus rhamnosus* PB01 reduziu o peso de camundongos C57BL/6 fêmeas que tiveram obesidade induzida por HFD.

Estes estudos e muitos outros descritos na literatura sugerem que os efeitos conhecidos como “anti-obesidade” vêm na sua maioria da suplementação com probióticos do gênero *Lactobacillus* (KOBLYIAK *et al.*, 2016). Visto que intervenções com probióticos originados de bactérias ácido lácticas (BAL) são capazes de reduzir os acúmulos de gorduras, representando um método de alteração natural da microbiota intestinal (YADAV *et al.*, 2013), e ainda, modular a expressão e secreção de hormônios relacionados ao metabolismo que podem melhorar a obesidade (TSAI; CHENG; PAN, 2014).

De acordo, Backhed *et al.*, 2007 níveis séricos de citocinas inflamatórias presentes na inflamação crônica de baixo grau, como por exemplo TNF- α , IL-6, IL-1 β e MCP-1, foram reduzidos em camundongos que receberam tratamento com probióticos originados de BAL, da mesma forma Park *et al.*, 2013 verificaram a redução das citocinas no tecido adiposo de camundongos obesos também tratados com BAL.

Seguindo essa linha, o nosso estudo se propôs a analisar os efeitos de um candidato probiótico da cepa *Lactobacillus rhamnosus* LB1.5 isolado de leite de búfala e seu potencial foi demonstrado *in vitro* por Breyer *et al.*, 2020. Com base no exposto, a hipótese central deste estudo é que a suplementação de probióticos, ao longo da vida do animal, pode ter efeito neuroprotetor ou até mesmo reverter os prejuízos causados no sistema nervoso central pela dieta hiperlipídica consumida ao longo da vida.

2. JUSTIFICATIVA

O uso de probióticos têm ganhado destaque e sendo bastante investigado devido ao seu potencial efeito na redução da produção de mediadores inflamatórios, atuando em vias de sinalização celular e tem se mostrado ser capaz de alterar o padrão de expressão de determinados genes. Levando esse cenário em consideração, nosso trabalho se propõe a estudar o papel do bulbo olfatório nesse contexto e como essas intervenções afetam seu funcionamento.

3. HIPÓTESE

A hipótese central deste estudo é de que a suplementação com probióticos será capaz de proteger o aparecimento de alterações metabólicas, comportamentais, imunológicas e genéticas causadas pela alimentação rica em gordura ao longo da vida.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da dieta hiperlipídica e da suplementação com probiótico na expressão de genes do sistema dopaminérgico, via neuroinflamatória e envolvidos na homeostase energética no bulbo olfatório. Além disso, analisar os efeitos desses tratamentos em parâmetros bioquímicos e memória de longo prazo em camundongos machos adultos.

4.2 Objetivos Específicos

- Analisar a expressão gênica, em nível transcricional, do receptor da dopamina (*Drd2*), tirosina hidroxilase (*Th*), fator neurotrófico derivado do cérebro (*Bdnf*), sirtuina (*Sirt1*), receptor de prolactina (*Prlr*) no bulbo olfatório;
- Quantificar a concentração sérica de glicose e triglicerídeos;
- Calcular o índice de Lee;
- Avaliar a memória de longo prazo.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado “**High-fat diet and probiotic supplementation do not alter memory but modulate gene expression in the olfactory bulb of mice**” foi submetido à revista *Brain Research Bulletin* com fator de impacto (2022): 3.715.

É possível consultar as normas exigidas no endereço eletrônico: <https://www.elsevier.com/journals/brain-research-bulletin/0361-9230/guide-for-authors>.

High-fat diet and probiotic supplementation do not alter memory but modulate gene expression in the olfactory bulb of mice

Brenda Fraga^a, Patrícia Molz^a, Nicole Hiller Bondarczuk^a, Natália Perin Schmidt^a, Gabriela Merker Breyer^b, Ana Carolina de Moura^a, Vanessa Feistauer^a, Amanda de Souza da Motta^b, Renata Padilha Guedes^a, Márcia Giovenardi^a

^a Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmiento Leite, 245, Porto Alegre, Brazil.

^b Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, Brazil.

*Corresponding Author: Dr. Márcia Giovenardi

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Rua Sarmiento Leite, 245, sala 308C - Prédio 1- 90050-170

Porto Alegre, RS, Brazil

e-mail: marciag@ufcspa.edu.br

Highlight

- HFD increases weight gain and Lee index.
- Probiotic supplementation and HFD do not affect long-term memory.
- HFD alters dopaminergic gene expression in the olfactory bulb.
- Sirt1 gene expression was decreased by diet and treatment with probiotics.
- HFD and probiotic do not change Prlr and Bdnf gene expression.

Abstract

In mammals, the relationship between olfactory systems and the homeostatic regulation of energy intake and expenditure is well established. Thus, this study aimed to evaluate the effect of candidate probiotic *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB1.5 on biochemical and anthropometric parameters, cognitive function, dopaminergic gene expression, and inflammatory markers in the olfactory bulb (OB) of male mice fed with a high-fat diet. Male mice (n=36) at 21 days of age received standard diet *ad libitum* (CONT), control diet plus probiotic (CONT+PROB), high-fat diet (HFD), and high-fat diet plus probiotic (HFD+PROB) for 16 weeks. The probiotic *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB1.5 supplementation was administered 3 times per week by gavage during the treatment. Around 105 days old, cognitive function was assessed by the object recognition test (ORT). At the end of the experiment, the serum triglycerides and glucose, weight gain, and Lee Index were measured. The relative gene expression of dopamine receptor (*Drd2*), tyrosine hydroxylase (*Th*), sirtuin (*Sirt1*), prolactin receptor (*Prlr*), and brain-derived neurotrophic factor (*Bdnf*) was also analyzed in the OB. We did not find significant differences among the studied groups regarding long-term recognition memory. There were no differences among serum triglycerides and glucose among the studied groups, but observed an effect of diet on weight gain and Lee's index. In the gene expression, we observed an effect of the probiotic led to a lower relative gene expression of *Drd2*. In addition, the relative expression of the *Th* gene was lower in the HFD+PROB group when compared to the HFD group. Also, we demonstrated the effect of diet and treatment on *Sirt1* gene expression, where there was a significant decrease in the HFD and CONT+PROB groups. On the other hand, there were no significant differences among groups in gene expression of the *Prlr* and *Bdnf*. In conclusion, HFD and probiotic supplementation did not alter long-term memory and biochemical parameters, but influenced the anthropometric parameters and modulated gene expression in the OB of adult male mice.

Keywords: *Drd2*, *Th*, *Sirt1*, *Prlr*, *Bdnf*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB1.5.

1 INTRODUCTION

The obesity epidemic presents an important risk factor to chronic diseases such as type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and cancer. One of the elements that drives the rapid increase in obesity is the obesogenic environment that stimulates the consumption of high-fat diets (Boone et al., 2021; Poessel et al., 2020). Moreover, studies have reported that rodent models fed a high-fat diet (HFD) developed cognitive impairments (Saiyasit et al., 2020; Fu et al., 2017; Tan and Norhaizan, 2019). One hypothesis to this evidence is that HFD has been associated with sensory impairment (Watson et al., 2020).

The main olfactory bulb (OB) is the brain region where the initial processing of odorous sensory information occurs. Neurons of the olfactory epithelium are responsible for the transduction of chemical molecules into an electric impulse (Rolls, 2006; van Duuren et al., 2008; Banerjee et al., 2013). Olfaction has recently been shown to shape homeostatic and maladaptive processes of food intake (Jovanovic and Riera, 2022). In this context, evidence has shown that weight gain is associated with changes in the olfactory system, as the perception of smell plays a significant role in the pleasure of eating, and the control of food intake. In mice, HFD is associated with reduced olfactory sensitivity (Katase et al., 2016), which directly affects consumption and frequency of food intake (Loch et al., 2015).

According to the World Health Organization, probiotics are defined as live microorganisms administered adequately to produce benefits for the host (Morelli and Capurso, 2012). Consequently, it is expected that the probiotics produce health benefits. For example, probiotics have been well known to modulate gut microbiota composition and are considered a possible treatment for cognitive impairment and other metabolic alterations (Kumar et al., 2022; Romo-Araiza and Ibarra, 2020). A probiotic candidate, *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB1.5, produced by raw buffalo milk, was selected for the further probiotic potential for presenting maintained cell viability after gastrointestinal simulation in vitro (Breyer et al., 2020).

Based on the above, the central hypothesis of this study is that probiotic supplementation throughout the animal's life can protect from cognitive dysfunction and negative alterations of gene expression in the OB of mice treated with a HFD. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of probiotic *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB1.5 on serum biochemical and anthropometric parameters, cognitive function, and gene expression in the

dopaminergic system, inflammatory markers, and energy homeostasis in the OB of males fed HFD.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Animals

Male (n=36) isogenic mice (*Mus musculus*) of the C57BL/6J strain, approximately 21 days old, weighing around 25-40 g were obtained from the Animal Housing Facility of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Animals were adequately housed, kept in acrylic boxes and maintained under controlled temperature ($23\pm 1^\circ\text{C}$), humidity ($55\pm 5\%$), and illumination (12 h light/dark cycle; lights on at 7 a.m.) conditions. The Ethics Committee for the Use of Animals at UFCSPA approved this study (number 722/21). All procedures performed followed the standards proposed by the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (Council for International Organizations of Medical Sciences – CIOMS) and Guidelines for Animal Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health and the Procedures for the Scientific Use of Animals Act (Act # 11.794, 8 October 2008). Every effort was made to minimize the number of animals used and their suffering.

2.2 Treatments

On the 21st day of age, males were randomly divided into four dietary groups: control (CONT), control plus probiotic (CONT+PROB), high-fat diet (HFD), and high-fat diet plus probiotic (HFD+PROB). The CONT group received standard chow (Nuvital, Curitiba, Brazil) *ad libitum*, with a total energy content of 3.4 kcal/g (63% carbohydrate, 26% protein, 11% fat). HFD group received a high fat chow (Pragsoluções Biociências, Jaú, Brazil) with a total energy content of 5 kcal/g (32.2% carbohydrate, 10.6% protein, 57.2% fat), and also received standard chow with the aim of replacing micronutrients and tooth wear. Diets' compositions are described in Table 1.

The probiotic strain *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB1.5 was previously isolated from raw buffalo milk, and Breyer et al. demonstrated its probiotic potential in vitro (Breyer et al., 2020). The probiotic dose (1.3×10^8 CFU/mL) and timing (three times a week) were chosen based on literature to maintain an adequate amount of probiotic in the animal's gut. Pavan et al. (2003) determined that the persistence of probiotic lactic acid bacteria (LAB) was about 10

days in mice gut after daily administration of 10^9 CFU/mL. Moreover, the chosen dose considered the bacterial viability after lyophilization, which is about 10^8 CFU/mL. *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB1.5 is viable in skim milk, even after lyophilization and storage. We analyzed the bacterial culture viability in skim milk after incubation and after 12 months (lyophilized and stored at -20 °C). We determined that the probiotic concentration remained at 10^8 CFU/mL.

The diets (CONT and HFD) were administered daily for 16 weeks, and simultaneously a supplementation with probiotic was administered 3 times per week by gavage. The groups that did not receive the probiotics, received skim milk in the same volume and frequency as the probiotic groups. During this period, food intake was measured weekly, and the data was used to calculate the average intake per day. The animals were weighed weekly to evaluate weight gain. At the end of the experiment, each animal's weight and length (nose-anus) was measured to evaluate the weight gain and obesity by the Lee index.

2.3 Behavioral Analysis

At 105 days of age, cognitive function by long-term recognition memory was assessed using the object recognition test (ORT). The ORT test was performed in an acrylic box (30.5 cm X 19.8 cm X 13.4 cm), in which animals were previously habituated for 5 minutes. Twenty-four hours after the habituation session, mice were placed in the same arena for the training session, containing two identical objects (A1 and A2), which they could freely explore for 5 minutes. For the evaluation of long-term memory (LTM), 24h after the training session, animals were set to explore the area for more 5 minutes in the presence of two different objects, the familiar object (A) and a novel object (B). All sessions were filmed and analyzed using stopwatches to register the time spent exploring during the experiment sessions. Exploration was defined by the amount of time spent actively sniffing or interacting with the object at a maximum distance of 2 cm. The “recognition index” (RI) was calculated by the ratio $TB / (TA+TB)$, where TA = time spent exploring the familiar object (A) and TB = time spent exploring the novel object (B) (Molz et al., 2021).

2.4 Tissue Collection

At 110 days of age, in the morning, the animals were decapitated after receiving an average dose of 240 mg/kg of ketamine and 30 mg/kg of xylazine intraperitoneally. Trunk blood was collected in sterile tubes, centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes at 4 °C,

separated the serum and stored at -80 °C for biochemical analysis. The olfactory bulb was macroscopically dissected and stored in RNA later™ stabilization solution (Invitrogen, São Paulo, Brazil) for later storage at -80 °C for subsequent molecular analysis.

2.5 Serum Analysis

The concentration of glucose and triglycerides in the serum were analyzed by enzymatic colorimetric method using commercial kits (Bioclin) according to the manufacturer's specifications.

2.6 Molecular Analysis

2.6.1 Total RNA Extraction

Total RNA from the olfactory bulb was extracted by the TRIzol® (Invitrogen, Brazil) method, according to the manufacturer's specifications. Samples were incubated with chloroform at room temperature and then centrifuged. After centrifugation, three phases were observed: one phase containing chloroform and phenol, one interphase, and one aqueous phase. The latter was removed for RNA isolation. Quantification was assessed by spectrometry BioSpec-nano® (Shimazu, Kioto, Japan) at 260nm and 280nm.

2.6.2 RT-PCR

After total RNA extraction, cDNA synthesis (complementary DNA) was performed by reverse transcription reactions (GoScript™ Reverse Transcription Kit, Promega, Brazil). A total of 1000 ng of RNA was incubated with oligo(dT), dNTPs, and DEPC (diethyl pyrocarbonate) water for 5 minutes at 65 °C, followed by 1 minute on ice. Then, buffer solution, DTT (dithiothreitol), and RNaseOUT were added for 2 minutes at 37 °C. Finally, M-MLV-RT enzyme was added for cDNA synthesis for 1 hour at 50 °C. Synthesis reaction was inactivated by incubation at 70 °C for 15 minutes.

2.6.3 Analysis of Gene Expression by qPCR

Table 2 shows all primer sequences used in this study, which were designed using the software Primer-3 based on mice mRNA sequences in the GenBank database. Primer's specificity was checked using BLAST search against nucleotide collection (nr) of the NCBI database. All primers were purchased from Invitrogen, São Paulo, Brazil.

In the olfactory bulb, we analyzed gene expression at the transcriptional level of dopamine receptor (*Drd2*), tyrosine hydroxylase (*Th*), sirtuin (*Sirt1*), prolactin receptor (*Prlr*), and brain-derived neurotrophic factor (*Bdnf*), using specific primers to amplify the cDNAs (10 ng of cDNA per well). Actin-beta (*Actb*) was used as a housekeeping gene, for internal control [19]. Amplification products were analyzed using the SYBR™ Green method by Real-Time PCR (Life Technologies, Brazil). CT (cycle threshold) value of each reaction was used to calculate the level of mRNA expression of that specific gene after normalization to the expression of the reference gene, which was analyzed in parallel in the same reaction plate. Relative quantification (mean of normalized expression to the housekeeping gene) was calculated by the $2^{-\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001).

2.7 Statistical Analyses

Statistical analyses were made using GraphPad Prism 9 (La Jolla, USA). The Kolmogorov-Smirnov test assessed data normality. Data were expressed as mean \pm S.E.M. Results were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3 RESULTS

Figure 1 shows the serum biochemical parameters of the CONT, CONT+PROB, HFD and HFD+PROB groups. Regarding these results, there was no significant difference in the serum concentrations of triglycerides and glucose (Figure 1A and B) ($p > 0.05$) in the studied groups. We found an increase in weight gain [$F(1,36)=6.288$; $p=0.0168$; Figure 1D] and the Lee index [$F(1,33)=4.306$; $p=0.0458$; Figure 1C] in the HFD group (diet effect) but no effect of probiotics.

We did not find statistical differences ($p > 0.05$) among groups in the long term recognition memory evaluated by the ORT test (Figure 2).

Drd2, *Th*, *Sirt1*, *Prlr*, and *Bdnf* gene expression in the OB were investigated by qPCR analysis (Figure 3). *Drd2* gene expression can be observed in Figure 3A. Two-way ANOVA showed probiotic effect [$F(1,22)=4.762$; $p=0.04$], by the reduced *Drd2* expression in the probiotic group when compared to control, but with no statistical difference detected in the post hoc test. Also we analyzed the *Th* gene expression, and observed the interaction between the factors, diet, and treatment [$F(1,22)=6.265$; $p < 0.0202$] and probiotic effect

[F(1,22)=5.627; $p=0.0269$]. In the post hoc test, we found that the relative gene expression of *Th* was lower in HFD+PROB when compared to HFD (Figure 3B). In the analysis of expression of *Sirt1* (Figure 3C), two-way ANOVA showed the interaction between the factors, diet, and treatment [F(1,19)=8.751; $p<0.0001$]. The post-hoc test showed the expression of *Sirt1* significantly decreased in the HFD group and CONT+PROB group ($p<0.01$ for both comparisons). On the other hand, we did not find significant differences among groups in gene expression of the *Prlr* (Figure 3D) and *Bdnf* (Figure 3E) ($p>0.05$).

4 DISCUSSION

This study investigated the effect of HFD and the candidate probiotic *Lactocaseibacillus rhamnosus* LB1.5 on cognitive function and gene expression in the olfactory bulb of adult males mice. The study showed that HFD did not cause cognitive impairment, and probiotic supplementation did not alter the long-term memory of these animals, when fed for 16 weeks. Furthermore, we demonstrated that males mice fed HFD+PROB had an decreased in *Th* gene expression compared to HFD. Also, mice fed HFD and CONT+PROB showed decreased *Sirt1* gene expression.

Prospective studies evaluating C57BL/6J male mice have shown that HFD fed causes a significant weight gain and increased levels of glucose, triglyceride and total cholesterol in the blood, but not in free fatty acid levels (Liu et al., 2016; Totten et al., 2020, Wang et al., 2020a). In our study, HFD for 16 weeks increased weight gain and Lee index, but did not show differences among groups for serum glucose and triglyceride concentrations. On the other hand, different to our results, other studies showed therapeutic potential effects of *Lactocaseibacillus rhamnosus* for ameliorating the metabolic alterations produced by HFD (Kim et al., 2016; Yang et al., 2021; Chen et al., 2021). For example, Chen et al. (2021) verified that the administration of *Lactocaseibacillus rhamnosus* LRH05 caused a significant decrease in body weight, body weight gain, and serum TG levels, and a modest reduction in blood glucose levels without significant difference.

It has already been demonstrated in humans and rodents that HFD consumption can cause cognitive impairment long before clear signs of obesity appear (Holloway et al., 2011; Beilharz et al., 2014; Beilharz et al., 2016). However, the effects of HFD on learning and memory can be influenced by many factors, such as diversity among animal strains, age, duration of exposure, and diet composition. Wang et al., (2020) inferred that brain regions

such as the hippocampus may be affected early by HFD and that biochemical changes and oxidative stress may contribute to the dysfunctions and cognitive disorders reported in these animals. Indeed, obesity and prolonged HFD feeding is associated with reduced olfactory sensitivity (Thiebaud et al., 2014; Fernández-Aranda et al., 2015; Takase et al., 2016). Curiously, our results showed that HFD did not lead to cognitive dysfunction, nor was probiotic supplementation able to alter long-term memory as measured by ORT. In this context, Leyh et al. (2021) reported that though HFD-induced obesity may have detrimental consequences for cognitive flexibility, the authors verified that long periods of excessive dietary fat alone do not cause learning deficits or spatial memory impairment, results similar to our study.

Bdnf plays an important role in neuroprotection in several brain regions, including the olfactory bulb. Wang et al. (2020b) demonstrated that HFD-fed mice displayed long-term memory impairments, but the performance before 7 weeks of treatment on behavioral tests relying on short-term memory was not affected. These changes could be explained in part by the alteration of synaptic plasticity through the negative regulation of BDNF expression in the brain (Kanoski et al., 2007; Xia et al., 2015). Our findings showed no influence of the HFD diet or probiotic supplementation on *Bdnf* gene expression in the OB of male mice. However, a previous study that evaluated *Bdnf* gene expression in the OB of female mice (C57BL/6J) treated with HFD for 16 weeks, showed significant upregulation in *Bdnf* expression (Totten et al., 2020).

Vucetic et al. (2012) showed that HFD alters the expression of genes related to the dopaminergic system in different areas of the brain. In the present study, we demonstrated that males fed HFD for 16 weeks showed increased *Th* gene expression when compared to HFD+PROB. This result is consistent with previous rodent studies, which reported an up-regulation of *Th* gene expression due to HFD in other brain regions. Mice HFD (35%) for 12 weeks showed up-regulation of *Th* and *Dat* (dopamine transporter) genes in the hypothalamus (Lee et al., 2010). Yet, Li et al. (2009) evaluated the ventromedial hypothalamus and found a decrease in *Th* gene expression. Totten et al. (2020) treated male mice (DBA/D2J) with HFD for 16 weeks and showed an upregulation of *Drd2* and *Th* gene expression in the OB.

As we already demonstrated, males HFD-fed for 16 weeks had an increased *Drd2* gene expression in the OB (probiotic effect). It has been reported that *Lacticaseibacillus*

Rhamnosus to young mice increased brain dopamine level (Divyashri et al., 2015), and with this the gut microbiota can produce specific cofactors such as tetrahydrobiopterin (BH4), fostering tyrosine hydroxylase (TH) activity in the brain, with consequent increase in the level of dopamine (Wang et al., 2021). A previous study (Feistauer et al., 2020) with mice showed that hyperlipidic diets modify the expression of genes of the dopaminergic system in the ventral tegmental area (VTA) of the offspring. However, mice fed HFD (35%) for 12 weeks showed no change in dopamine receptor 1 (*Drd1*) or *Drd2* receptors gene expression in the hypothalamus (Lee et al., 2010). An aspect being considered is the influence of genetics on the response of obesogenic diets in the brain. For example, Totten et al. (2020) analyzed different strains of mice (B6J and D2J) and observed opposite trends in the regulation of genes of the dopaminergic system in the olfactory bulb.

Previous studies have already shown that Sirt1 protein levels in the central nervous system (CNS) are modulated by the nutritional status of the animal (Bordone et al., 2007; Ramadori et al., 2008; de Oliveira et al., 2022). Moreover, has been reported that in different tissues the Sirt1 was increased by nutrient deprivation (Cohen et al., 2004; Ramadori et al., 2008). The increase of Sirt1, during negative energy balance may influence in metabolic shift occurred (Liu et al., 2008), led energy expenditure more significant than energy intake. Sirt1 also promotes the deacetylation of transcription factors, causing a reduction in the activation of pro-inflammatory pathways (Fu et al., 2017b). We verified that HFD and probiotics supplementation decreased gene expression of *Sirt1* in the BO. Our results are in line with the literature, as it has been described that diets rich in lipids and carbohydrates cause neuroinflammation (Valdearcos et al., 2017, Feijó et al., 2022, Neto et al., 2022).

Several metabolic related tissues of the body, such as the hypothalamus, adipose tissue, pancreas, liver, and intestine are responsive to prolactin and potentially contribute to the modulatory role of this neuropeptide in energy homeostasis in the adult (Ben-Jonathan et al., 2006; Lopez-Vicchi et al., 2020). In CNS, the prolactin receptors are found in the choroid plexus, bed nucleus of stria terminalis, amygdala, the central gray part of the midbrain, thalamus, hypothalamus, cerebral cortex, and olfactory bulb (Freeman et al., 2000). A previous study (Gauthier et al., 2022) showed that dams, when fed a hypercaloric and restrictive diet, promote a decrease in *Prlr* and estrogen receptor alpha gene expression in the hypothalamus of their female offspring. In our study, we did not find differences in *Prlr* gene expression in the OB of animals fed with HFD or supplemented with probiotics.

5 CONCLUSIONS

In conclusion, our results demonstrated that male mice, 21 days old, fed for 16 weeks with a HFD (fat 60%), and supplemented with the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* LB1.5 (3 times a week), did not present a change in long-term memory. Our results also show that the gene expression of *Drd2*, *Th*, and *Sirt1*, in the olfactory bulb, is affected by diet or by supplementation with the probiotic. However, there were no significant differences among groups in *Prlr* and *Bdnf* gene expression in the OB of mice fed with a HFD.

Funding: This study was supported by PROAP/UFCSPA (Programa de Apoio à Pós-Graduação/Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre) and UFCSPA.

REFERENCES

- Banerjee, K., Akiba, Y., Baker, H., & Cave, J. W. (2012). Epigenetic control of neurotransmitter expression in olfactory bulb interneurons. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *31*(6), 415–423. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2012.11.009>
- Beilharz, J. E., Maniam, J., & Morris, M. J. (2014). Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, *37*, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.11.016>
- Beilharz, J. E., Maniam, J., & Morris, M. J. (2016). Short-term exposure to a diet high in fat and sugar, or liquid sugar, selectively impairs hippocampal-dependent memory, with differential impacts on inflammation. *Behavioural Brain Research*, *306*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.03.018>
- Ben-Jonathan, N., Hugo, E. R., Brandebourg, T. D., & LaPensee, C. R. (2006). Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *17*(3), 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.02.005>
- Boone, M. H., Liang-Guallpa, J., & Krashes, M. J. (2021). Examining the role of olfaction in dietary choice. *Cell Reports*, *34*(7), 108755. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108755>
- Bordone, L., Cohen, D., Robinson, A., Motta, M. C., Van Veen, E., Czopik, A., Steele, A. D., Crowe, H., Marmor, S., Luo, J., Gu, W., & Guarente, L. (2007). SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell*, *6*(6), 759–767. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00335.x>
- Breyer, G. M., Arechavaleta, N. N., Siqueira, F. M., & de Souza da Motta, A. (2020). Characterization of Lactic Acid Bacteria in Raw Buffalo Milk: a Screening for Novel Probiotic Candidates and Their Transcriptional Response to Acid Stress. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *13*(2), 468–483. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09700-4>
- Chen, Y., Chiou, S., Hsu, A., Lin, Y., & Lin, J. (2021). Lactobacillus rhamnosus Strain LRH05 Intervention Ameliorated Body Weight Gain and Adipose Inflammation via Modulating the Gut Microbiota in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, *66*(1), 2100348. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202100348>
- Cohen, H. Y., Miller, C., Bitterman, K.J., Wall, N. R., Hekking, B., Kessler, B., Howitz, K. T., Gorospe, M., de Cabo, R., & Sinclair, D. A. (2004). Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science*, *305*(5682), 390–392. <https://doi.org/10.1126/science.1099196>

- de Oliveira, T. Q., de Moura, A. C., Feistauer, V., Damiani, R., Braga, M. F., Almeida, S., Guedes, R. P., & Giovenardi, M. (2022). Caloric restriction in mice improves short-term recognition memory and modifies the neuroinflammatory response in the hippocampus of male adult offspring. *Behavioural Brain Research*, 425, 113838. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2022.113838>
- Divyashri, G., Krishna, G., Muralidhara, & Prapulla, S. G. (2015). Probiotic attributes, antioxidant, anti-inflammatory and neuromodulatory effects of *Enterococcus faecium* CFR 3003: in vitro and in vivo evidence. *Journal of Medical Microbiology*, 64(12), 1527–1540. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000184>
- Feijó, G. D. S., Jantsch, J., Correia, L. L., Eller, S., Furtado-Filho, O. V., Giovenardi, M., Porawski, M., Braganhol, E., & Guedes, R. P. (2022). Neuroinflammatory responses following zinc or branched-chain amino acids supplementation in obese rats. *Metabolic Brain Disease*, 37(6), 1875–1886. <https://doi.org/10.1007/s11011-022-00996-5>
- Feistauer, V., Fisch, J., da Silva Oliveira, C. K., Giovenardi, M., & Almeida, S. (2020). Restriction and hyperlipidic diets during pregnancy, lactation and adult life modified the expression of dopaminergic system related genes both in female mice and their adult offspring. *Brain Research Bulletin*, 162, 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.06.019>
- Fernández-Aranda, F., Agüera, Z., Fernández-García, J. C., Garrido-Sanchez, L., Alcaide-Torres, J., Tinahones, F. J., Giner-Bartolomé, C., Baños, R. M., Botella, C., Cebolla, A., de la Torre, R., Fernández-Real, J. M., Ortega, F. J., Frühbeck, G., Gómez-Ambrosi, J., Granero, R., Islam, M. A., Jiménez-Murcia, S., Tárrega, S., & Menchón, J. M. (2015). Smell–taste dysfunctions in extreme weight/eating conditions: analysis of hormonal and psychological interactions. *Endocrine*, 51(2), 256–267. <https://doi.org/10.1007/s12020-015-0684-9>
- Fu, Y., Chen, Y., Li, L., Wang, Y., Kong, X., & Wang, J. (2017b). Food restriction affects Y-maze spatial recognition memory in developing mice. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 60(1), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.03.010>
- Fu, Z., Wu, J., Nesil, T., Li, M. D., Aylor, K. W., & Liu, Z. (2017a). Long-term high-fat diet induces hippocampal microvascular insulin resistance and cognitive dysfunction. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 312(2), E89–E97. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00297.2016>

- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerante, A., & Nagy, A. L. (2000). Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiological Reviews*, 80(4), 1523-631. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11015620/>
- Gauthier, M. F., de Andrade, A. A., Fisch, J., Feistauer, V., Morás, A. M., Reinhardt, L. S., de Moura, A. C., Moura, D. J., de Almeida, S., Guedes, R. P., & Giovenardi, M. (2022). Dietary interventions in mice affect oxidative stress and gene expression of the Prlr and Esr1 in the adipose tissue and hypothalamus of dams and their offspring. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 78(1), 271–282. <https://doi.org/10.1007/s13105-021-00862-5>
- Holloway, C. J., Cochlin, L. E., Emmanuel, Y., Murray, A., Codreanu, I., Edwards, L. M., Szmigielski, C., Tyler, D. J., Knight, N. S., Saxby, B. K., Lambert, B., Thompson, C., Neubauer, S., & Clarke, K. (2011). A high-fat diet impairs cardiac high-energy phosphate metabolism and cognitive function in healthy human subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(4), 748–755. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.002758>
- Jovanovic, P., & Riera, C. E. (2022). Olfactory system and energy metabolism: a two-way street. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 33(4), 281–291. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2022.01.004>
- Kanoski, S., Meisel, R., Mullins, A., & Davidson, T. (2007). The effects of energy-rich diets on discrimination reversal learning and on BDNF in the hippocampus and prefrontal cortex of the rat. *Behavioural Brain Research*, 182(1), 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.05.004>
- Kumar, V., Naik, B., Kumar, A., Khanduri, N., Rustagi, S., & Kumar, S. (2022). Probiotics media: significance, challenges, and future perspective - a mini review. *Food Production, Processing and Nutrition*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s43014-022-00098-w>
- Lee, A. K., Mojtahed-Jaberi, M., Kyriakou, T., Astarloa, E. A.-O., Arno, M., Marshall, N. J., Brain, S. D., & O'Dell, S. D. (2010). Effect of high-fat feeding on expression of genes controlling availability of dopamine in mouse hypothalamus. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 26(4), 411–422. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.05.007>
- Leyh, J., Winter, K., Reinicke, M., Ceglarek, U., Bechmann, I., & Landmann, J. (2021). Long-term diet-induced obesity does not lead to learning and memory impairment in adult mice. *PLOS ONE*, 16(9), e0257921. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257921>
- Li, Y., South, T., Han, M., Chen, J., Wang, R., & Huang, X.-F. (2009). High-fat diet decreases tyrosine hydroxylase mRNA expression irrespective of obesity susceptibility in mice. *Brain Research*, 1268, 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.02.075>

- Liu, T.-W., Cephas, K. D., Holscher, H. D., Kerr, K. R., Mangian, H. F., Tappenden, K. A., & Swanson, K. S. (2016). Nondigestible Fructans Alter Gastrointestinal Barrier Function, Gene Expression, Histomorphology, and the Microbiota Profiles of Diet-Induced Obese C57BL/6J Mice. *The Journal of Nutrition*, *146*(5), 949–956. <https://doi.org/10.3945/jn.115.227504>
- Liu, Y., Dentin, R., Chen, D., Hedrick, S., Ravnskjaer, K., Schenk, S., Milne, J., Meyers, D. J., Cole, P., III, J. Y., Olefsky, J., Guarente, L., & Montminy, M. (2008). A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange. *Nature*, *456*(7219), 269–273. <https://doi.org/10.1038/nature07349>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, *25*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Loch, D., Breer, H., & Strotmann, J. (2015). Endocrine Modulation of Olfactory Responsiveness: Effects of the Orexigenic Hormone Ghrelin. *Chemical Senses*, *40*(7), 469–479. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjv028>
- Lopez-Vicchi, F., De Winne, C., Brie, B., Sorianello, E., Ladyman, S. R., & Becu-Villalobos, D. (2020). Metabolic functions of prolactin: Physiological and pathological aspects. *Journal of Neuroendocrinology*, *32*(11). <https://doi.org/10.1111/jne.12888>
- Molz, P., de Freitas, B. S., Uberti, V. H., da Costa, K. M., Kist, L. W., Bogo, M. R., & Schröder, N. (2021). Effects of lipoic acid supplementation on age- and iron-induced memory impairment, mitochondrial DNA damage and antioxidant responses. *European Journal of Nutrition*, *60*(7), 3679–3690. <https://doi.org/10.1007/s00394-021-02541-z>
- Morelli, L., & Capurso, L. (2012). FAO/WHO Guidelines on Probiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, *46*, S1–S2. <https://doi.org/10.1097/mcg.0b013e318269fdd5>
- Neto, J., Jantsch, J., Oliveira, S. de, Braga, M. F., Castro, L. F. dos S., Diniz, B. F., Moreira, J. C. F., Giovenardi, M., Porawski, M., & Guedes, R. P. (2022). DHA/EPA supplementation decreases anxiety-like behaviour, but it does not ameliorate metabolic profile in obese male rats. *British Journal of Nutrition*, *128*(5), 964–974. <https://doi.org/10.1017/S0007114521003998>
- Pavan, S., Desreumaux, P., & Mercenier, A. (2003). Use of Mouse Models To Evaluate the Persistence, Safety, and Immune Modulation Capacities of Lactic Acid Bacteria. *Clinical and Vaccine Immunology*, *10*(4), 696–701. <https://doi.org/10.1128/cdli.10.4.696-701.2003>

- Poessel, M., Breuer, N., Joshi, A., Pampel, A., Villringer, A., Hummel, T., & Horstmann, A. (2020). Reduced Olfactory Bulb Volume in Obesity and Its Relation to Metabolic Health Status. *Frontiers in Human Neuroscience*, *14*, 586998. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2020.586998>
- Ramadori, G., Lee, C. E., Bookout, A. L., Lee, S., Williams, K. W., Anderson, J., Elmquist, J. K., & Coppari, R. (2008). Brain SIRT1: Anatomical Distribution and Regulation by Energy Availability. *Journal of Neuroscience*, *28*(40), 9989–9996. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3257-08.2008>
- Rolls, E. T. (2006). Brain mechanisms underlying flavour and appetite. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *361*(1471), 1123–1136. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1852>
- Romo-Araiza, A., & Ibarra, A. (2020). Prebiotics and probiotics as potential therapy for cognitive impairment. *Medical Hypotheses*, *134*, 109410. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2019.109410>
- Saiyasit, N., Chunchai, T., Prus, D., Suparan, K., Pittayapong, P., Apaijai, N., Pratchayasakul, W., Sripetchwandee, J., Chattipakorn, M.D., Ph.D., N., & Chattipakorn, S. C. (2020). Gut dysbiosis develops before metabolic disturbance and cognitive decline in high-fat diet-induced obese condition. *Nutrition*, *69*, 110576. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.110576>
- Takase, K., Tsuneoka, Y., Oda, S., Kuroda, M., & Funato, H. (2016). High-fat diet feeding alters olfactory-, social-, and reward-related behaviors of mice independent of obesity. *Obesity*, *24*(4), 886–894. <https://doi.org/10.1002/oby.21441>
- Tan, B. L., & Norhaizan, M. E. (2019). Effect of High-Fat Diets on Oxidative Stress, Cellular Inflammatory Response and Cognitive Function. *Nutrients*, *11*(11), 2579. <https://doi.org/10.3390/nu11112579>
- Thiebaud, N., Johnson, M. C., Butler, J. L., Bell, G. A., Ferguson, K. L., Fadool, A. R., Fadool, J. C., Gale, A. M., Gale, D. S., & Fadool, D. A. (2014). Hyperlipidemic Diet Causes Loss of Olfactory Sensory Neurons, Reduces Olfactory Discrimination, and Disrupts Odor-Reversal Learning. *Journal of Neuroscience*, *34*(20), 6970–6984. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3366-13.2014>

- Totten, M. S., Pierce, D. M., & Erikson, K. M. (2020). Diet-Induced Obesity Disrupts Trace Element Homeostasis and Gene Expression in the Olfactory Bulb. *Nutrients*, *12*(12), 3909. <https://doi.org/10.3390/nu12123909>
- Valdearcos, M., Douglass, J. D., Robblee, M. M., Dorfman, M. D., Stifler, D. R., Bennett, M. L., Gerritse, I., Fasnacht, R., Barres, B. A., Thaler, J. P., & Koliwad, S. K. (2017). Microglial Inflammatory Signaling Orchestrates the Hypothalamic Immune Response to Dietary Excess and Mediates Obesity Susceptibility. *Cell Metabolism*, *26*(1), 185-197.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.05.015>
- van Duuren, E., Lankelma, J., & Pennartz, C. M. A. (2008). Population Coding of Reward Magnitude in the Orbitofrontal Cortex of the Rat. *Journal of Neuroscience*, *28*(34), 8590–8603. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5549-07.2008>
- Vucetic, Z., Carlin, J. L., Totoki, K., & Reyes, T. M. (2012). Epigenetic dysregulation of the dopamine system in diet-induced obesity. *Journal of Neurochemistry*, *130*(6), 891-898. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07649.x>
- Wang, M., Zhang, B., Hu, J., Nie, S., Xiong, T., & Xie, M. (2020a). Intervention of five strains of Lactobacillus on obesity in mice induced by high-fat diet. *Journal of Functional Foods*, *72*, 104078. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104078>
- Wang, Y., Tong, Q., Ma, S.-R., Zhao, Z.-X., Pan, L.-B., Cong, L., Han, P., Peng, R., Yu, H., Lin, Y., Gao, T.-L., Shou, J.-W., Li, X.-Y., Zhang, X.-F., Zhang, Z.-W., Fu, J., Wen, B.-Y., Yu, J.-B., Cao, X., & Jiang, J.-D. (2021). Oral berberine improves brain dopa/dopamine levels to ameliorate Parkinson's disease by regulating gut microbiota. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00456-5>
- Wang, Z., Ge, Q., Wu, Y., Zhang, J., Gu, Q., & Han, J. (2020b). Impairment of Long-term Memory by a Short-term High-fat Diet via Hippocampal Oxidative Stress and Alterations in Synaptic Plasticity. *Neuroscience*, *424*, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.10.050>
- Watson, L. S., Stone, T. D., Williams, D., Williams, A. S., & Sims-Robinson, C. (2020). High-Fat Diet Impairs Tactile Discrimination Memory in the Mouse. *Behavioural Brain Research*, *382*, 112454. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112454>
- Xia, S.-F., Xie, Z.-X., Qiao, Y., Li, L.-R., Cheng, X.-R., Tang, X., Shi, Y.-H., & Le, G.-W. (2015). Differential effects of quercetin on hippocampus-dependent learning and memory in

mice fed with different diets related with oxidative stress. *Physiology & Behavior*, *138*, 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.09.008>

Yang, M., Zheng, J., Zong, X., Yang, X., Zhang, Y., Man, C., & Jiang, Y. (2021). Preventive Effect and Molecular Mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* JL1 on Food-Borne Obesity in Mice. *Nutrients*, *13*(11), 3989. <https://doi.org/10.3390/nu13113989>

TABLES AND FIGURES

Table 1. The main macronutrients in Nuvilab CR-1 standard rat chow (NuVital, Curitiba, Brazil) and hiperlipidic rat chow (Pragsoluções, São Paulo, Brazil)

Compositions	Standard rat chow*		Hiperlipidic rat chow*	
	g	kcal	g	kcal
Carbohydrate	53,6	214,2	40,3	161,0
Protein	22,1	88,4	13,3	53,0
Fat	4,2	37,4	31,8	286,0
Dietary fiber	7	-	0	-
Minerals	0,3 ^a	-	3,5 ^b	-
Vitamins	0,014 ^c	-	1,0 ^d	-

*composition in 100 g of chow.

^aMineral content of sodium, manganese, zinc, copper, iodide, selenium, cobalt, fluor, and iron.

^bAIN-93 mineral mix.

^cVitamin content of A, D3, E, K, B1, B2, B5, B6, B7B9, and B12 vitamins.

^dAIN-93 vitamin mix.

Table 2. Primers used for SYBR® Green assays.

Gene	Primer F	Primer R
<i>Bdnf</i>	5'TTGTTTTGTGCCGTTTACCA'3	5'GGTAAGAGAGCCAGCCACTG'3
<i>Prlr</i>	5'GCTTGCTGGGAAGTACGGAA'3	5'TTTCTCCGGATCCGTTTCG'3
<i>Sirt1</i>	5'GGCCGCGGATAGGTCCATA'3	5'ACAATCTGCCACAGCGTCAT'3
<i>Drd2</i>	5'GACACCACTCAAGGGCAACT3'	5'TCCATTCTCCGCCTGTTCAC3'
<i>Th</i>	5'TACAAGCAGGGTGAGCCAAT3'	5'TGGGTAGCATAGAGGCCCTT3'
<i>Actb</i>	5'AGATCAAGATCATTGCTCCTCCT'3	5'ACGCAGCTCAGTAACAGTCC'3

Abbreviations: *Bdnf*: brain-derived neurotrophic factor; *Prlr*: prolactin receptor; *Sirt1*: sirtuin 1; *Drd2*: dopamine receptor; *Th*: tyrosine hydroxylase; *Actb*: actin beta.

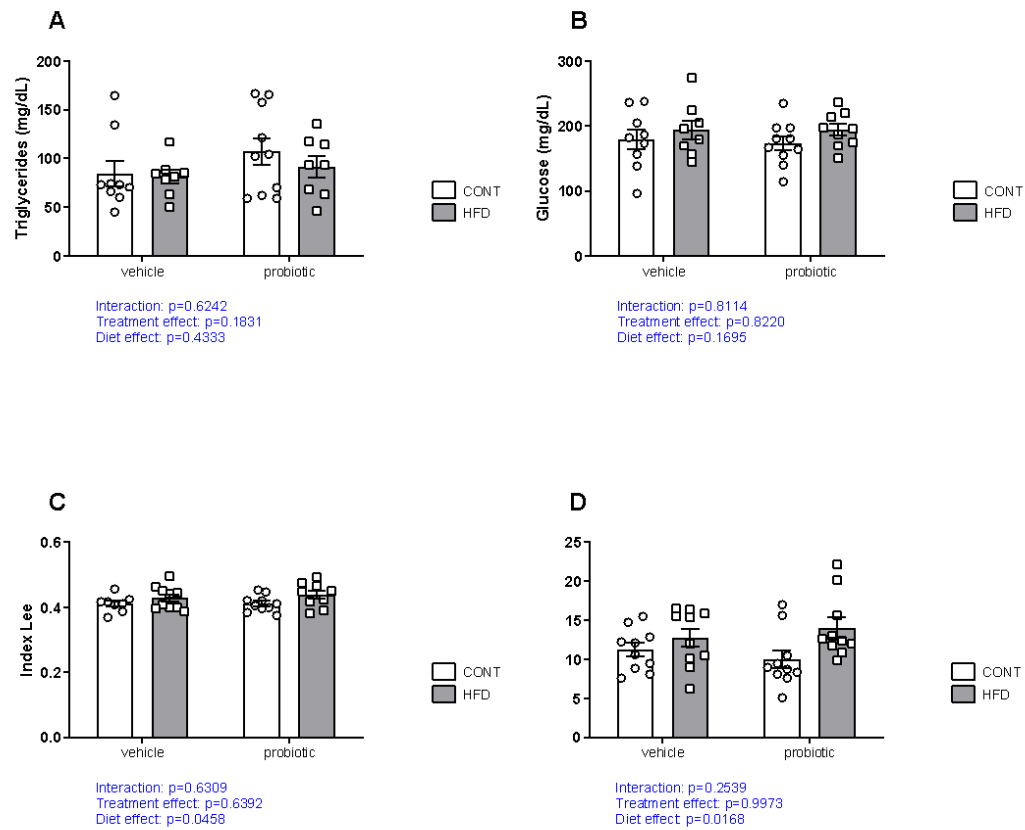


Figure 1. Serum triglycerides (A), glucose (B), Lee index (C) and weight gain (D) of control (CONT, $n=9-10$), control plus probiotic (CONT+PROB, $n=8-10$), high-fat diet (HFD, $n=10$) and high-fat diet plus probiotic (HFD+PROB, $n=8-10$) group. Data are expressed as mean \pm SEM compared by two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.

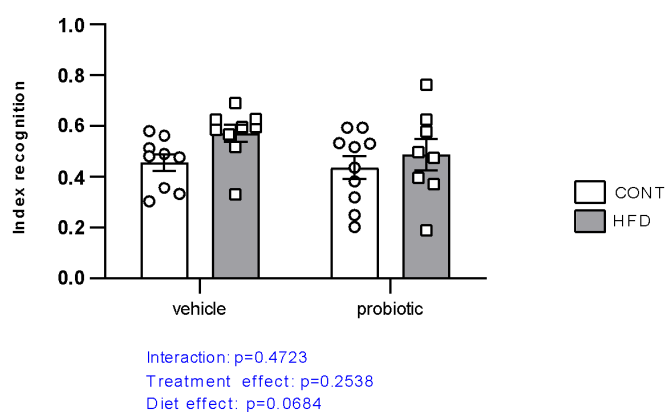


Figure 2. Long-term recognition memory of standard (CONT, n=9), standard plus probiotic (CONT+PROB, n=9), high-fat diet (HFD, n=10) and high-fat diet plus probiotic (HFD+PROB, n=8) group was evaluated by the object recognition test (ORT). Data are expressed as mean \pm SEM compared by two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test.

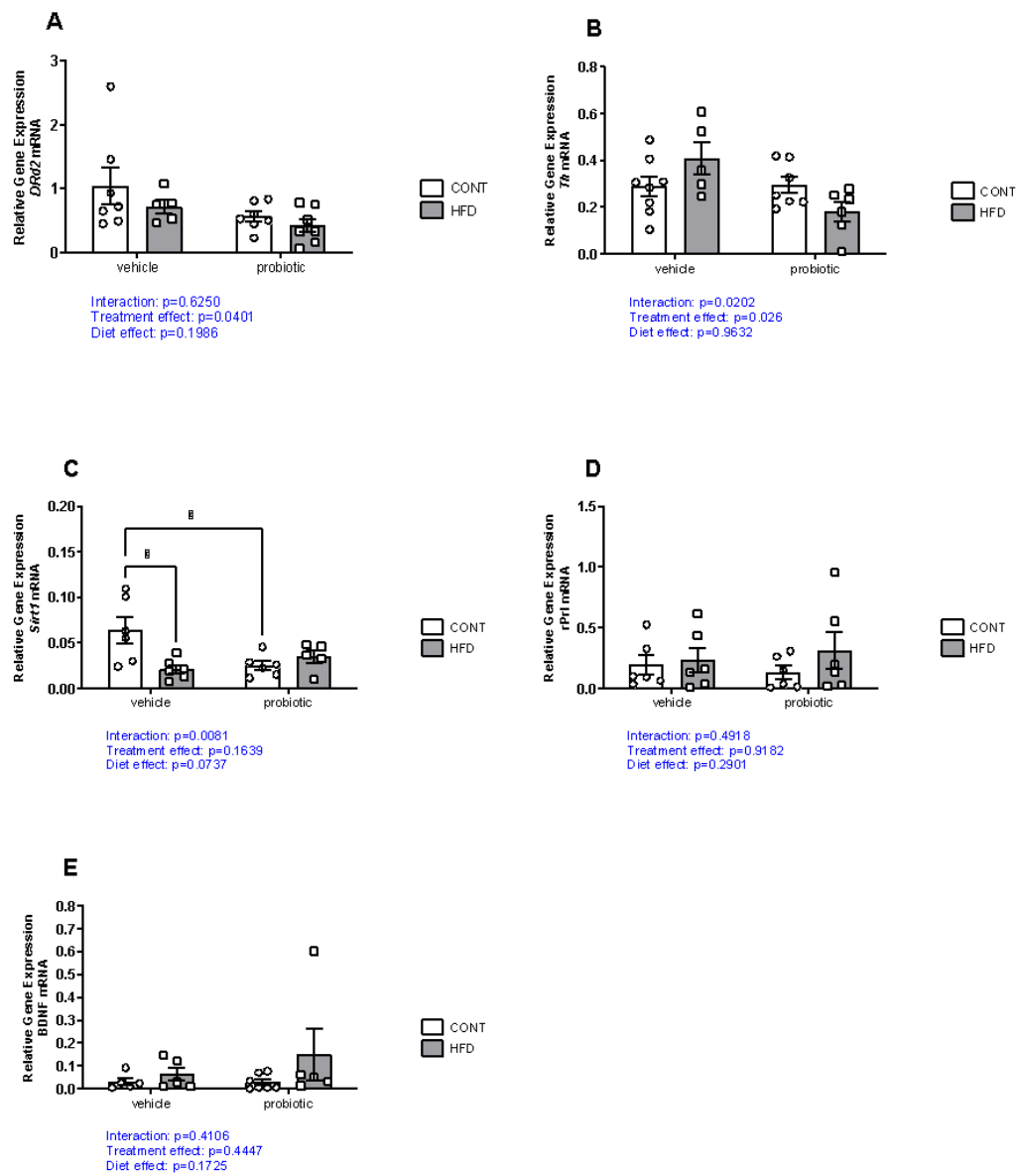


Figure 3. Relative gene expression of dopamine receptor (Drd2, A), tyrosine hydroxylase (Th, B), sirtuin (Sirt1, C), prolactin receptor (Prlr, D) and brain-derived neurotrophic factor (Bdnf, E) in the olfactory bulb of standard (CONT, $n=5-8$), standard plus probiotic (CONT+PROB, $n=6-7$), high-fat diet (HFD, $n=5-6$) and high-fat diet plus probiotic (HFD+PROB, $n=5-7$) group. Data are expressed as mean \pm SEM compared by two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. $*p<0.01$ in comparison to the HFD and CONT+PROB group.

6. DISCUSSÃO

Nosso estudo investigou o efeito da HFD e do candidato a probiótico *Lactocaseibacillus rhamnosus* LB1.5 na função cognitiva e na expressão gênica no bulbo olfatório de camundongos machos adultos. Os principais achados do estudo mostraram que HFD por 16 semanas não causou comprometimento cognitivo e a suplementação de probióticos não alterou a memória de longo prazo desses animais. Além disso, demonstramos que camundongos machos alimentados com HFD tiveram um aumento na expressão do gene *Th* em comparação com HFD+PROB. E ainda, camundongos alimentados com HFD e CONT+PROB apresentaram diminuição da expressão do gene *Sirt1*.

Estudos prospectivos avaliando camundongos machos C57BL/6J mostraram que a alimentação com HFD causa um ganho de peso significativo e aumento dos níveis de glicose, triglicerídeos e colesterol total no sangue, mas não nos níveis de ácidos graxos livres (LIU *et al.*, 2016; TOTTEN *et al.*, 2020, Wang *et al.*, 2020). Em nosso estudo, HFD por 16 semanas aumentou o ganho de peso e o índice de Lee, mas não mostrou diferenças entre os grupos para as concentrações séricas de glicose e triglicerídeos.

Por outro lado, diferentemente dos nossos resultados, outros estudos mostraram potenciais efeitos terapêuticos do *Lactocaseibacillus rhamnosus* para melhorar as alterações metabólicas produzidas pela HFD (KIM *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2021; CHEN *et al.*, 2021). Chen *et al.* (2021) verificaram que a administração do *Lactocaseibacillus rhamnosus* LRH05 causou uma diminuição significativa no peso corporal, ganho de peso corporal e níveis séricos de TG, e uma redução modesta nos níveis de glicose no sangue sem diferença significativa.

Já foi demonstrado em humanos e roedores que o consumo de HFD pode causar comprometimento cognitivo muito antes de aparecerem sinais claros de obesidade (HOLLOWAY *et al.*, 2011; BEILHARZ *et al.*, 2014; BEILHARZ *et al.*, 2016). No entanto, os efeitos da HFD no aprendizado e na memória podem ser influenciados por muitos fatores, como diversidade entre as linhagens de animais, idade, duração da exposição e composição da dieta. Wang *et al.*, (2020) concluíram que regiões cerebrais como o hipocampo podem ser afetadas precocemente pela HFD e que alterações bioquímicas e estresse oxidativo podem contribuir para as

disfunções e distúrbios cognitivos relatados nesses animais. De fato, a obesidade e a alimentação prolongada com HFD estão associadas à sensibilidade olfativa reduzida (THIEBAUD *et al.*, 2014; FERNÁNDEZ-ARANDA *et al.*, 2015; TAKASE *et al.*, 2016).

Curiosamente, nossos resultados mostraram que a HFD não levou à disfunção cognitiva, nem a suplementação de probióticos foi capaz de alterar a memória de longo prazo medida pela ORT. Nesse contexto, Leyh *et al.* (2021) relataram que, embora a obesidade induzida por HFD possa ter consequências prejudiciais para a flexibilidade cognitiva, os autores verificaram que longos períodos de excesso de gordura na dieta por si só não causam déficits de aprendizado ou comprometimento da memória espacial, resultados semelhantes ao nosso estudo.

7. CONCLUSÕES

A partir dos nossos resultados podemos concluir que:

- O consumo de HFD e a suplementação com o *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB 1.5 não alteraram os níveis séricos de glicose e triglicerídeos, assim como não provocaram prejuízo na memória de longo-prazo;
- A dieta HFD causou efeito no índice de Lee destes animais;
- HFD e/ou a suplementação com o *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB 1.5 alteram a expressão gênica do *Drd2*, da *Th* e da *Sirt1* no BO de machos adultos. No entanto, não alteram a expressão gênica do *Bdnf* e do *Prlr*.

REFERÊNCIAS

AIMÉ, P. *et al.* Fasting increases and satiation decreases olfactory detection for a neutral odor in rats. **Behavioural Brain Research**, [S.L.], v. 179, n. 2, p. 258–264, 2007.

AGGARWAL, J.; SWAMI, G.; KUMAR, M. Probiotics and their Effects on Metabolic Diseases: an update. **Journal Of Clinical And Diagnostic Research**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 173–177, 2013.

ALIPOUR, H. *et al.* Modulatory Effect of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* PB01 on Mechanical Sensitivity in a Female Diet-Induced Obesity Model. **Pain Research And Management**, [S.L.], v. 2021, p. 1–8, 2021.

ALMEIDA-SUHETT, C. P. *et al.* Behavioral changes in male mice fed a high-fat diet are associated with IL-1 β expression in specific brain regions. **Physiology & Behavior**, [S.L.], v. 169, p. 130–140, 2017.

BÄCKHED, F. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 101, n. 44, p. 157181–5723, 2004.

BASKIN, D. G. *et al.* Regional concentrations of insulin in the rat brain. **Endocrinology**, [S.L.], v. 112, n. 3, p. 898–903, 1983.

BAUM, M. J. Sexual differentiation of pheromone processing: links to male-typical mating behavior and partner preference. **Hormones And Behavior**, [S.L.], v. 55, n. 5, p. 579-588, 2009.

BEILHARZ, J. E.; MANIAM, J.; MORRIS, M. J. Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, [S.L.], v. 37, p. 134–141, 2014.

BEILHARZ, J. E.; MANIAM, J.; MORRIS, M. J. Short-term exposure to a diet high in fat and sugar, or liquid sugar, selectively impairs hippocampal-dependent memory, with differential impacts on inflammation. **Behavioural Brain Research**, [S.L.], v. 306, p. 1–7, 2016.

BREYER, G. M. *et al.* Characterization of Lactic Acid Bacteria in Raw Buffalo Milk: a screening for novel probiotic candidates and their transcriptional response to acid stress. **Probiotics And Antimicrobial Proteins**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 468–483, 2020.

CAI, D. *et al.* Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 183–190, 2005.

CANI, P.D. *et al.* Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. **Diabetes**, [S.L.], v. 57, n. 6, p. 1470–1481, 2008.

CHOMPRES, G. *et al.* A one month high fat diet disrupts the gut microbiome and integrity of the colon inducing adiposity and behavioral despair in male Sprague Dawley rats. **Heliyon**, [S.L.], v. 8, n. 11, p. 1-15, 2022.

CORDNER, Z.A.; K.L.K. Tamashiro, Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. **Physiology & Behavior**, v. 152, p. 363–371, 2015.

DAUMAS-MEYER, V. *et al.* Fasting induces astroglial plasticity in the olfactory bulb glomeruli of rats. **Glia**, [S.L.], v. 66, n. 4, p. 762–776, 2018.

DEVASKAR, S. U. *et al.* Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. **Journal of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 269, n. 11, p. 8445–8454, 1994.

DRUCE, M. R. *et al.* Ghrelin increases food intake in obese as well as lean subjects. **International Journal Of Obesity**, London, v. 29, n. 9, p. 1130–1136, 2005.

ENNIS, M.; HAMILTON, K. A.; HAYAR, A. Neurochemistry of the Main Olfactory System. **Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology**, New York, p. 139–204, 2007.

FADOOL, D. A.; TUCKER, K.; PEDARZANI, P.. Mitral Cells of the Olfactory Bulb Perform Metabolic Sensing and Are Disrupted by Obesity at the Level of the Kv1.3 Ion Channel. **Plos One**, [S.L.], v. 6, n. 9, p. 1-14, 2011.

FERNÁNDEZ-ARANDA, F. *et al.* Smell–taste dysfunctions in extreme weight/eating conditions: analysis of hormonal and psychological interactions. **Endocrine**, [S.L.], v. 51, n. 2, p. 256–267, 2015.

Food and Agriculture Organization (FAO). World Health Organization (WHO). Health and Nutrition Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, Rome, 2006.

FORD, E.S.; GILES, W.H.; MOKDAD, A.H. Increasing Prevalence of the Metabolic Syndrome Among U.S. Adults. **Diabetes Care**, [S.L.], v. 27, n. 10, p. 2444–2449, 2004.

GOODPASTER, B. H. *et al.* Obesity, Regional Body Fat Distribution, and the Metabolic Syndrome in Older Men and Women. **Archives Of Internal Medicine**, [S.L.], v. 165, n. 7, p. 777–783, 2005.

HALÁSZ, N.; SHEPHERD, G. M. Neurochemistry of the vertebrate olfactory bulb. **Neuroscience**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 579–619, 1983.

HENQUIN, J. C. The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in β -cells. **Diabetes Research and Clinical Practice**, [S.L.], v. 93, n. SUPPL. 1, p. S27–S31, 2011.

HILL, J. M. *et al.* Autoradiographic localization of insulin receptors in rat brain: Prominence in olfactory and limbic areas. **Neuroscience**, [S.L.], v. 17, n. 4, p. 1127–1138, 1986.

HOLLOWAY, C. J. *et al.* A high-fat diet impairs cardiac high-energy phosphate metabolism and cognitive function in healthy human subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [S.L.], v. 93, n. 4, p. 748–755, 2011.

HSIA, A. Y. *et al.* Dopamine Depresses Synaptic Inputs Into the Olfactory Bulb. **Journal Of Neurophysiology**, [S.L.], v. 82, n. 2, p. 1082–1085, 1999.

JULLIARD, A. K. *et al.* Changes in rat olfactory detection performance induced by orexin and leptin mimicking fasting and satiation. **Behavioural Brain Research**, [S.L.], v. 183, n. 2, p. 123–129, 2007.

KHARE, A.; GAUR, S. Cholesterol-Lowering Effects of Lactobacillus Species. **Current Microbiology**, [S.L.], v. 77, n. 4, p. 638–644, 2020.

KIM, K.A. *et al.* High Fat Diet-Induced Gut Microbiota Exacerbates Inflammation and Obesity in Mice via the TLR4 Signaling Pathway. **Plos One**, [S.L.], v. 7, n. 10, p. 1–11, 2012.

KIYOKAGE, E. *et al.* Molecular Identity of Periglomerular and Short Axon Cells. **Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 30, n. 3, p. 1185-1196, 20 jan. 2010.

KOBYLIAK, N. *et al.* Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view. **Nutrition & Metabolism**, London, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2016.

KOJIMA, M. *et al.* Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, [S.L.], v. 402, n. 6762, p. 656–660, 1999.

KOSAKA, Katsuko. *et al.* How simple is the organization of the olfactory glomerulus?:

the heterogeneity of so-called periglomerular cells. **Neuroscience Research**, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 101–110, 1998.

LABORDE, J. E.; SÁEZ-SANTIAGO, E. Association between obesity and symptoms of depression of adults in Puerto Rico. **Puerto Rico health sciences journal**, v. 32, p. 132–137, 2013.

LEYH, J. *et al.* Long-term diet-induced obesity does not lead to learning and memory impairment in adult mice. **PLOS ONE**, [S.L.], v. 16, n. 9, p. e0257921, 2021.

LIU, T.-W. *et al.* Nondigestible Fructans Alter Gastrointestinal Barrier Function, Gene Expression, Histomorphology, and the Microbiota Profiles of Diet-Induced Obese C57BL/6J Mice. **The Journal of Nutrition**, [S.L.], v. 146, n. 5, p. 949–956, 2016.

LOCH, D.; BREER, H.; STROTMANN, J. Endocrine modulation of olfactory responsiveness: Effects of the orexigenic hormone ghrelin. **Chemical Senses**, [S.L.], v. 40, n. 7, p. 469–479, 2015.

MILLER, A. A.; SPENCER, S. J. Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment. **Brain, Behavior, And Immunity**, [S.L.], v. 42, p. 10–21, 2014.

MORASH, B. *et al.* Leptin Gene Expression in the Brain and Pituitary Gland. **Endocrinology**, [S.L.], v. 140, n. 12, p. 5995–5998, 2014.

NEGRÃO, A. B.; LICINIO, J. Leptina: o diálogo entre adipócitos e neurônios. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [S.L.], v. 44, n. 3, p. 205–214, 2000.

PALAZZO, R. P. *et al.* Early life exposure to hypercaloric diet impairs eating behavior during weaning: the role of Bdnf signaling and astrocyte marks. **International Journal Of Developmental Neuroscience**, [S.L.], v. 80, n. 7, p. 667–678, 2020.

PALOUZIER-PAULIGNAN, B. *et al.* Olfaction under metabolic influences. **Chemical Senses**, [S.L.], v. 37, n. 9, p. 769–797, 2012.

PANZANELLI, P. *et al.* GABAergic phenotype of periglomerular cells in the rodent olfactory bulb. **The Journal Of Comparative Neurology**, [S.L.], v. 502, n. 6, p. 990-1002, 2007.

PARK, D. *et al.* Supplementation of *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032 in Diet-Induced Obese Mice Is Associated with Gut Microbial Changes and Reduction in Obesity. **Plos One**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 1v–12, 2013.

PARRISH-AUNGST, S. *et al.* Quantitative analysis of neuronal diversity in the mouse olfactory bulb. **The Journal Of Comparative Neurology**, [S.L.], v. 501, n. 6, p. 825–836, 2007.

PETZOLD, G. C.; HAGIWARA, A.; MURTHY, V. N. Serotonergic modulation of odor input to the mammalian olfactory bulb. **Nature Neuroscience**, [S.L.], v. 12, n. 6, p. 784-791, 2009.

PRUD'HOMME, M. J. *et al.* Nutritional status modulates behavioural and olfactory bulb Fos responses to isoamyl acetate or food odour in rats: roles of orexins and leptin. **Neuroscience**, [S.L.], v. 162, n. 4, p. 1287–1298, 2009.

RIERA, C. E. *et al.* The Sense of Smell Impacts Metabolic Health and Obesity. **Cell Metabolism**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 198-211.e5, 2017.

SÁNCHEZ-ANDRADE, G.; JAMES, B. M.; KENDRICK, K. M. Neural encoding of olfactory recognition memory. **Journal of Reproduction and Development**, [S.L.], v. 51, n. 5, p. 547–558, 2005.

SAKANO, H. Developmental regulation of olfactory circuit formation in mice. **Development, Growth & Differentiation**, v. 62, n. 4, p. 199–213, 28 fev. 2020.

SHIPLEY, M. T., & ENNIS, M. Functional organization of olfactory system. **Journal of Neurobiology**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 123–176, 1996.

SHIPLEY, M.T., ENNIS, M., PUCHE, A.C. The Olfactory System. **Neuroscience in Medicine**, Totowa, NJ. 2003.

STUNKARD, A. J.; FAITH, M. S.; ALLISON, K. C. Depression and obesity. **Biological Psychiatry**, [S.L.], v. 54, n. 3, p. 330–337, 2003.

TAKASE, K. *et al.* High-fat diet feeding alters olfactory-, social-, and reward-related behaviors of mice independent of obesity. **Obesity**, [S.L.], v. 24, n. 4, p. 886–894, 2016.

THIEBAUD, N. *et al.* Hyperlipidemic diet causes loss of olfactory sensory neurons, reduces olfactory discrimination, and disrupts odor-reversal learning. **Journal of Neuroscience**, [S.L.], v. 34, n. 20, p. 6970–6984, 2014.

TOIDA, K. Synaptic organization of the olfactory bulb based on chemical coding of neurons. **Anatomical Science International**, Kuramoto, v. 83, p. 207–217, 2008.

TOTTEN, M. S.; PIERCE, D. M.; ERIKSON, K. M. Diet-Induced Obesity Disrupts Trace Element Homeostasis and Gene Expression in the Olfactory Bulb. **Nutrients**, v. 12, n. 12, p. 3909, 1 dez. 2020.

TRAYHURN, P.; BING, C. Appetite and energy balance signals from adipocytes. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, Liverpool, v. 361, p. 1237–1249, 2006.

TSAI, Y.; CHENG, P.; PAN, T.. Anti-obesity effects of gut microbiota are associated with lactic acid bacteria. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 98, n. 1, p. 1–10, 2013.

WANG, M. et al. Intervention of five strains of *Lactobacillus* on obesity in mice induced by high-fat diet. **Journal of Functional Foods**, v. 72, p. 104078, set. 2020.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003.

WHALLEY, K. Comer bem para melhorar o olfato? **Nature Reviews Neuroscience** 15 , 429, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrn3771>

WHITTEN W. K.; CHAMPLIN A. K. The role of olfaction in mammalian reproduction. *Handbook of Physiology – Endocrinology II*, Baltimore, p. 109-123, 1959.

YADAV, H. et al. Beneficial Metabolic Effects of a Probiotic via Butyrate-induced GLP-1 Hormone Secretion. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 288, n. 35, p. 25088–25097, 2013.

YANG, M. et al. Preventive Effect and Molecular Mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* JL1 on Food-Borne Obesity in Mice. **Nutrients**, v. 13, n. 11, p. 3989, 9 nov. 2021.

YOO, S. et al. Probiotics *L. plantarum* and *L. curvatus* in Combination Alter Hepatic Lipid Metabolism and Suppress Diet-Induced Obesity. **Obesity**, [S.L.], v. 21, n. 12, p. 2571–2578, 2013.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) Nº 722/21.



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº: 273/20

2) DATA DO PARECER: 13 de janeiro de 2021 Parecer 722/21

3) TÍTULO DO PROJETO:

Análise de intervenções na dieta, em diferentes fases do desenvolvimento, através da avaliação de parâmetros comportamentais, bioquímicos, imunológicos e genéticos.

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Márcia Giovanardi

5) RESUMO DO PROJETO:

O projeto tem como objetivo avaliar os efeitos de intervenções na dieta (restrição calórica, probióticos e dieta hipercalórica), em diferentes fases da vida do animal, através da análise de parâmetros comportamentais, bioquímicos, imunológicos e genéticos. A hipótese central deste estudo é que a restrição calórica e a administração de probióticos no período gestacional e lactacional poderão proteger a interface materno fetal, além de prevenir na vida adulta e na senescência, o aparecimento de alterações metabólicas, comportamentais, imunológicas e genéticas causadas pela alimentação hipercalórica ao longo da vida. Para testar essa hipótese, este projeto propõe a utilização de camundongos machos (n=322) e fêmeas (n=300) da linhagem C57BL/6J, mantidos no biotério da UFCSPA, que serão divididos em 4 experimentos. Para os experimentos I e II, as fêmeas (n=10/grupo) receberão um dos 5 diferentes tipos de dieta: dieta controle (CONT, dieta padrão, *ad libitum*); dieta restritiva (RD, redução de 40% da dieta padrão), dieta controle + probiótico (PB), dieta hipercalórica (HD, dieta com cerca de 30% a mais de Kcal do que a dieta normal, *ad libitum*) e dieta hipercalórica + probiótico (HD+PB, dieta com cerca de 30% a mais de Kcal do que a dieta normal, *ad libitum*) e livre acesso à água. O probiótico será administrado diariamente por gavagem. Já para os experimentos III (n=10/grupo) e IV (n=12/grupo), machos com 21 dias de idade, após o desmame, também receberão um dos 5 diferentes tipos de dieta e passarão por testes de comportamento ao longo da vida. No material biológico coletado serão determinados os níveis das citocinas pró e anti-inflamatórias, ácidos graxos e fator de crescimento na placenta; os níveis das citocinas pró-inflamatórias no hipotálamo, hipocampo e córtex cerebral. Também será avaliada a permeabilidade da barreira hematoencefálica; o estado de ativação microglial e astrocitária no córtex cerebral e hipocampo; o nível de infiltração linfocitária no tecido nervoso; a expressão da sirtuína-1, do *tol-like receptor-4* (TLR-4) e NLRP3 no hipocampo e no córtex cerebral; a neuroplasticidade no hipotálamo, hipocampo e córtex cerebral; e, a expressão do POMC e receptor de leptina no hipotálamo. Os dados estudados serão expressos por média \pm erro padrão, e analisados quanto à normalidade. Os dados paramétricos serão analisados por ANOVA de um ou duas vias (de acordo com o objetivo) seguida de Post-Hoc e, os não-



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

paramétricos serão analisados por Kruskal-Wallis. O nível de significância aceito será de $p < 0,05$.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Objetivo geral:

Avaliar os efeitos de intervenções na dieta (restrição calórica, probióticos e dieta hipercalórica), em diferentes fases da vida do animal através da análise de parâmetros comportamentais, bioquímicos, imunológicos e genéticos.

Objetivos específicos:

- Determinar os níveis das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, ácidos graxos e fator de crescimento na placenta das mães;
- Determinar os níveis das citocinas pró-inflamatórias no hipotálamo, hipocampo e córtex cerebral;
- Avaliar a permeabilidade da barreira hematoencefálica;
- Avaliar o estado de ativação microglial e astrocitária no córtex cerebral e hipocampo;
- Avaliar o nível de infiltração linfocitária no tecido nervoso;
- Analisar a expressão da sirtuina-1, do *tol-like receptor-4* (TLR-4) e NLRP3 no hipocampo e no córtex cerebral;
- Avaliar a neuroplasticidade no hipotálamo, hipocampo e córtex cerebral;
- Analisar a expressão do POMC e receptor de leptina no hipotálamo.

7) FINALIDADE DO PROJETO:

Ensino Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título	<input checked="" type="checkbox"/> Adequado	<input type="checkbox"/> Comentários
Introdução	<input checked="" type="checkbox"/> Adequada	<input type="checkbox"/> Comentários
Objetivos	<input checked="" type="checkbox"/> Adequados	<input type="checkbox"/> Comentários
Relevância e Justificativa	<input checked="" type="checkbox"/> Adequados	<input type="checkbox"/> Comentários
Materiais e Métodos	<input checked="" type="checkbox"/> Adequados	<input type="checkbox"/> Comentários
Cronograma para execução da pesquisa	<input checked="" type="checkbox"/> Adequado	<input type="checkbox"/> Comentários
Orçamento e fonte financiadora	<input checked="" type="checkbox"/> Adequados	<input type="checkbox"/> Comentários
Referências Bibliográficas	<input checked="" type="checkbox"/> Adequadas	<input type="checkbox"/> Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Sim Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B C D E

Justifique:

Espécie:

Número Amostral:



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Redução Amostral: Sim Não

Justifique:

Substituição de Metodologia: Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia: Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais: Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais: Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Não se aplica

Anestesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Biotério/Labotatório):

Biotério da UFCSPA.

Laboratório de Fisiologia Comportamental e Metabólica.

Laboratório de Biologia Molecular

Laboratório de Patologia

Outra instituição. Qual?

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
Não definido	Camundongo	Machos	222
	isogênico	Fêmeas	150

12) RECOMENDAÇÃO: As pendências deverão ser respondidas em uma carta, indicando as páginas do projeto que foram alteradas (nova versão), assinadas pelo pesquisador responsável.

Aprovado

Com Pendência

Não aprovado



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Data de Início: 01/06/2020 e Data de Término: 31/05/2023

Comentários gerais sobre o projeto:

Aceito o adendo solicitando mais 15 animais: 7 machos e 8 fêmeas.

" A CEUA informa que conforme a Portaria nº 29/2020/Reitoria, de 3/julho/2020 da UFCSPA, as atividades presenciais seguem suspensas, sendo assim os cronogramas experimentais dos projetos devem atender o apresentado pela UFCSPA. Modificações na liberação das atividades presenciais por parte da Universidade, necessitará ajustes nos cronogramas quando necessário."

CURRÍCULO LATTES



Brenda Santos Fraga

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/5497834301742492>

ID Lattes: **5497834301742492**

Última atualização do currículo em 13/10/2022

Possui graduação em biomedicina pelo Centro Universitário Ritter dos Reis (UNIRITTER), onde obteve bolsa integral pelo Programa Universidade para todos (PROUNI). Possui habilitação em histotecnologia clínica e microbiologia, com experiência em anatomia patológica pelo Laboratório Central de Anatomia e Citopatologia do Estado do Rio Grande do Sul (Hospital Sanatório Partenon), além de experiência com processos de qualidade de produtos e serviços pelo Laboratório de Microbiologia do Hospital Dom Vicente Scherer (Santa Casa). Durante a graduação prestou monitoria nas disciplinas de Análises Clínicas II e Práticas em Biomedicina I. Atualmente é mestranda em Biotecnologia pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), seguindo a linha de pesquisa neurobiologia celular e molecular. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Brenda Santos Fraga
Nome em citações bibliográficas	FRAGA, B. S.
Lattes ID	http://lattes.cnpq.br/5497834301742492

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2020	Mestrado em andamento em BIOCÊNCIAS (Conceito CAPES 4). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil. Título: Estudo do bulbo olfatório de animais adultos que foram submetidos a diferentes dietas ao longo da vida.. Orientador: Márcia Giovenardi. Coorientador: Vanessa Feistauer. Palavras-chave: bulbo olfatório; neuroinflamação; dieta hipercalórica; dieta de restrição. Grande área: Ciências Biológicas
2016 - 2019	Graduação em Biomedicina. Centro Universitário Ritter dos Reis, UniRITTER, Brasil. Título: O Contexto da Histerectomia no Sistema Único de Saúde Brasileiro.. Orientador: Dra Virgínia Meneghini Lazzari. Bolsista do(a): ProUni, PROUNI, Brasil.

Formação Complementar

2021 - 2021	BIOSSEGURANÇA EM TEMPOS DA COVID-19. (Carga horária: 2h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
2020 - 2020	R para não programadores: analisando dados do TCGA. (Carga horária: 2h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
2020 - 2020	How to write a Review paper. (Carga horária: 2h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
2020 - 2020	Protocolos de Manejo Clínico do Coronavírus (COVID-19). (Carga horária: 15h). Ministério da Saúde, MS, Brasil.
2020 - 2020	Coronavírus (COVID-19): Manejo dos Casos Suspeitos.. (Carga horária: 1h). Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, IIEPAE, Brasil.
2019 - 2019	Extensão universitária em Curso de Extensão em Técnicas Histológicas 5ª edição. (Carga horária: 8h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

2019 - 2019	Mini Curso de Uroanálise. (Carga horária: 4h). Centro Universitário Ritter dos Reis, UniRITTER, Brasil.
2019 - 2019	Resistência Bacteriana. (Carga horária: 4h). D&D Cursos em Saúde, D&D, Brasil.
2016 - 2016	Curso de Extensão em Medicina Legal. (Carga horária: 10h). Instituto Galeno, INST GALENO, Brasil.

Atuação Profissional

Centro Universitário Ritter dos Reis, UniRITTER, Brasil.

Vínculo institucional 2019 - 2019	Vínculo: Monitor, Enquadramento Funcional: Monitoria Análises Clínicas II, Carga horária: 4
Vínculo institucional 2019 - 2019	Vínculo: Monitor, Enquadramento Funcional: Monitoria Práticas em Biomedicina I, Carga horária: 3
Vínculo institucional 2018 - 2018	Vínculo: Monitor, Enquadramento Funcional: Monitoria
Outras informações	Participante na qualidade de Monitora no evento XIX Salão de Extensão Universitária e no evento XX Jornada de Iniciação Científica, ambos durante a XIV SEPesq - Semana de Extensão, Pesquisa e Pós-Graduação no período de 26 a 29 de novembro de 2018, no Centro Universitário Ritter dos Reis.

Qualijá, QUALIJÁ, Brasil.

Vínculo institucional 2019 - 2019	Vínculo: Estágio Voluntário, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 10
Outras informações	Estágio voluntário em Gestão da Qualidade aplicada à Laboratório Clínico, desenvolvendo atividades como, elaboração de documentos técnicos para laboratório clínico de acordo com a RDC 302/2005 e o Programa de Acreditação em Laboratório Clínico - SBPC (PALC).

Hospital Sanatório Partenon, HSP, Brasil.

Vínculo institucional 2019 - 2019	Vínculo: Estágio curricular, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 30
Outras informações	Estágio curricular em Histotecnologia Clínica, desenvolvendo atividades como, recebimento, cadastramento e processamento de amostras histológicas, além de digitação e envio de laudos.

Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, ISCMPA, Brasil.

Vínculo institucional 2019 - 2019	Vínculo: Estágio curricular, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 25
Outras informações	Estágio curricular em Microbiologia, desenvolvendo atividades como, controle de qualidade interno e externo, controle de temperaturas dos equipamentos, preparação de meios de cultivos, preparação de amostras para teste, análises microbiológicas em águas, reagentes, fórmulas lácteas, leite humano, ar ambiente, tecido humano, testes biológicos de esterilização e coloração de gram.

Laboratório Médico Doutor Maricondi, MARICONDI, Brasil.

Vínculo institucional 2020 - 2021	Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Biomédica, Carga horária: 40
Outras informações	Biomédica coordenadora de equipe em unidade de testes rápidos de COVID-19, situada na Refinaria Alberto Pasqualini na cidade de Canoas-RS.

Idiomas

Inglês	Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.
Espanhol	Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

Produções

Produção bibliográfica

Apresentações de Trabalho

1. ★ FERRI, M. H. ; **FRAGA, B. S.** ; FISCH, J. ; MOURA, A. C. ; FEISTAUER, V. ; REINHARDT, L. S. ; MOLZ, P. ; MORAS, A. M. ; MOURA, D. J. ; SOUZA, P. O. ; BRAGANHOL, E. ; GUEDES, R. P. ; BARSCHAK, A. G. ; GIOVENARDI, M. . Effects of different maternal diet on adipose tissue inflammation and liver tissue oxidative stress in dams mice and their female offspring,. 2022. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. ★ **FRAGA, B. S.**; FERRI, M. H. ; BONDARCZUK, N. H. ; SCHMIDT, N. P. ; BREYER, G. M. ; MOURA, A. C. ; MOLZ, P. ; BARSCHAK, A. G. ; MOTTA, A. S. ; GUEDES, R. P. ; GIOVENARDI, M. . Effects of different diets and probiotic supplementation during pregnancy on placental morphology and cytokines and biochemical parameters in mice. 2022. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. **FRAGA, B. S.**; FERRI, M. H. ; FISCH, J. ; MOURA, A. C. ; FEISTAUER, V. ; REINHARDT, L. S. ; MOLZ, P. ; MORAS, A. M. ; MOURA, D. J. ; SOUZA, P. O. ; BRAGANHOL, E. ; GUEDES, R. P. ; BARSCHAK, A. G. ; GIOVENARDI, M. . Efeito da dieta materna na inflamação do tecido adiposo em camundongos fêmeas. 2022. (Apresentação de Trabalho/Outra).
4. ★ **FRAGA, B. S.**; MOLZ, P. ; FEISTAUER, V. ; MOURA, A. C. ; SCHMIDT, N. P. ; BONDARCZUK, N. H. ; FERRI, M. H. ; BREYER, G. M. ; MOTTA, A. S. ; CRESTANI, T. ; GUEDES, R. P. ; GIOVENARDI, M. . Efeito da intervenção de diferentes dietas e suplementação com probiótico no bulbo olfatório de camundongos machos adultos. 2022. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
5. ★ MOLZ, P. ; SCHMIDT, N. P. ; **FRAGA, B. S.** ; FERRI, M. H. ; CRESTANI, T. B. ; SANTOS, D. R. ; BONDARCZUK, N. H. ; BREYER, G. M. ; MOURA, A. C. ; BARSCHAK, A. G. ; MOTTA, A. S. ; GUEDES, R. P. ; GIOVENARDI, M. . Comportamento de impulsividade e do tipo ansioso em camundongos machos alimentados com diferentes dietas e suplementados com probiótico. 2022. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
6. FERRI, M. H. ; **FRAGA, B. S.** ; FISCH, J. ; MOURA, A. C. ; FEISTAUER, V. ; REINHARDT, L. S. ; MOLZ, P. ; MORAS, A. M. ; MOURA, D. J. ; SOUZA, P. O. ; BRAGANHOL, E. ; GUEDES, R. P. ; BARSCHAK, A. G. ; GIOVENARDI, M. . Efeito das dietas hipercalórica e de restrição em parâmetros de estresse oxidativo e interleucinas no tecido hepático de camundongos fêmeas. 2022. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. Congresso Brasileiro On-line de Comportamento Alimentar, Alimentação e Saúde - IV CONBRACAS. 2022. (Congresso).
2. I Congresso Brasileiro em Biotecnologias Aplicadas à Saúde. Estudo do bulbo olfatório de animais adultos que foram submetidos a diferentes dietas ao longo da vida.. 2022. (Congresso).
3. III Congresso Brasileiro de Saúde On-Line. 2022. (Congresso).
4. Uso Racional de Medicamentos: impacto na saúde do indivíduo, da comunidade e do ambiente. 2022. (Seminário).
5. XXXVI Reunião Anual da FESBE 2022, LVII Congresso Anual da SBFIS e I Congresso DOHaD Brasil, Effects of different diets and probiotic supplementation during pregnancy on placental morphology and cytokines and biochemical parameters in mice. 2022. (Congresso).
6. VI Encontro do PPG Biotecnologias. Estudo do bulbo olfatório de animais adultos que foram submetidos a diferentes dietas ao longo da vida.. 2021. (Encontro).
7. V Biosciences Meeting ? Crossing Borders. Estudo do bulbo olfatório de animais adultos que foram submetidos a diferentes dietas ao longo da vida.. 2020. (Encontro).
8. Entendendo o SUS: Controle Social - Vislumbres Para O Futuro. 2019. (Seminário).
9. Experiências de Estágio no HSP. Relato de experiência: estágio curricular no Laboratório Central de Anatomia Patológica e Citopatologia do Hospital Sanatório Partenon do Estado do Rio Grande do Sul. 2019. (Feira).
10. Experiências na Educação Popular em Saúde. 2019. (Outra).

Educação e Popularização de C & T

Apresentações de Trabalho

1. ★ FERRI, M. H. ; **FRAGA, B. S.** ; FISCH, J. ; MOURA, A. C. ; FEISTAUER, V. ; REINHARDT, L. S. ; MOLZ, P. ; MORAS, A. M. ; MOURA, D. J. ; SOUZA, P. O. ; BRAGANHOL, E. ; GUEDES, R. P. ; BARSCHAK, A. G. ; GIOVENARDI, M. . Effects of different maternal diet on adipose tissue inflammation and liver tissue oxidative stress in dams mice and their female offspring,. 2022. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. ★ **FRAGA, B. S.**; FERRI, M. H. ; BONDARCZUK, N. H. ; SCHMIDT, N. P. ; BREYER, G. M. ; MOURA, A. C. ; MOLZ, P. ; BARSCHAK, A. G. ; MOTTA, A. S. ; GUEDES, R. P. ; GIOVENARDI, M. . Effects of different diets and probiotic supplementation during pregnancy on placental morphology and cytokines and biochemical parameters in mice. 2022. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. **FRAGA, B. S.**; FERRI, M. H. ; FISCH, J. ; MOURA, A. C. ; FEISTAUER, V. ; REINHARDT, L. S. ; MOLZ, P. ; MORAS, A. M. ; MOURA, D. J. ; SOUZA, P. O. ; BRAGANHOL, E. ; GUEDES, R. P. ; BARSCHAK, A. G. ; GIOVENARDI, M. . Efeito da dieta materna na inflamação do tecido adiposo em camundongos fêmeas. 2022. (Apresentação de Trabalho/Outra).

4. ★ **FRAGA, B. S.**; MOLZ, P.; FEISTAUER, V.; MOURA, A. C.; SCHMIDT, N. P.; BONDARCZUK, N. H.; FERRI, M. H.; BREYER, G. M.; MOTTA, A. S.; CRESTANI, T.; GUEDES, R. P.; GIOVENARDI, M. . Efeito da intervenção de diferentes dietas e suplementação com probiótico no bulbo olfatório de camundongos machos adultos. 2022. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
5. ★ MOLZ, P.; SCHMIDT, N. P.; **FRAGA, B. S.**; FERRI, M. H.; CRESTANI, T. B.; SANTOS, D. R.; BONDARCZUK, N. H.; BREYER, G. M.; MOURA, A. C.; BARSCHAK, A. G.; MOTTA, A. S.; GUEDES, R. P.; GIOVENARDI, M. . Comportamento de impulsividade e do tipo ansioso em camundongos machos alimentados com diferentes dietas e suplementados com probiótico. 2022. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
6. FERRI, M. H.; **FRAGA, B. S.**; FISCH, J.; MOURA, A. C.; FEISTAUER, V.; REINHARDT, L. S.; MOLZ, P.; MORAS, A. M.; MOURA, D. J.; SOUZA, P. O.; BRAGANHOL, E.; GUEDES, R. P.; BARSCHAK, A. G.; GIOVENARDI, M. . Efeito das dietas hipercalórica e de restrição em parâmetros de estresse oxidativo e interleucinas no tecido hepático de camundongos fêmeas. 2022. (Apresentação de Trabalho/Outra).