

UNIVERSIDADE PAULISTA

**CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL E FISIOPATOLÓGICA
REPRODUTIVA E DE TRATO DIGESTÓRIO EM MODELO MURINO
DE INTOLERÂNCIA À LACTOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Patologia Ambiental e
Experimental da Universidade Paulista para a
obtenção do título de Doutor em Patologia
Ambiental e Experimental, sob orientação do
Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten

NATHALIA DE ANDRADE GALVÃO

SÃO PAULO

2023

NATHALIA DE ANDRADE GALVÃO

**CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL E FISIOPATOLÓGICA
REPRODUTIVA E DE TRATO DIGESTÓRIO EM MODELO MURINO
DE INTOLERÂNCIA À LACTOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental

Orientador: Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva

Instituição: Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista - Vice-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (VRPPG/UNIP)

Doutorado em Patologia Ambiental e Experimental

Área de concentração: Patologia Ambiental e Experimental

Linha de pesquisa: Patologia Integrada e Translacional

SÃO PAULO

DEZEMBRO / 2023

Galvão, Nathalia de Andrade.

Caracterização comportamental e fisiopatológica reprodutiva e de trato digestório em modelo murino de intolerância à lactose / Nathalia de Andrade Galvão. - 2023.

77 f. : il. color. + CD-ROM.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2023.

Área de concentração: Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva.

1. Diarreia. 2. Modelo experimental. 3. Reprodução. 4. Ratos.
5. Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. 6. Intestino. I. Kirsten, Thiago Berti (orientador). II. Silva, Rodrigo Augusto da (coorientador).
III. Título.

NATHALIA DE ANDRADE GALVÃO

**CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL E FISIOPATOLÓGICA
REPRODUTIVA E DE TRATO DIGESTÓRIO EM MODELO MURINO
DE INTOLERÂNCIA À LACTOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*
em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade
Paulista para a obtenção do título de Doutor em Patologia
Ambiental e Experimental

Aprovado(a) em: ___/___/_____

Banca Examinadora

Prof (a). Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof (a). Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof (a). Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof (a). Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof (a). Dr.(a) _____

Instituição: _____ Julgamento _____

O presente trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES/PROSUP, processo número 88887.601918/2021-00), Código de Financiamento 001.

“A ciência e a vida cotidiana não podem - e não devem - ser separadas. A ciência fornece uma explicação parcial sobre a vida mas, até onde consegue chegar, é baseada em fatos, experiências e experimentos”

Rosalind Franklin, numa carta enviada ao pai em 1940

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten, toda gratidão. Obrigada pela credibilidade depositada em mim, desde o Mestrado. Por toda confiança, orientação, paciência, compreensão e dedicação despendida que foi essencial para a iniciação e finalização deste trabalho. Eterna gratidão.

Agradeço ao Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva pela coorientação e tempo disponibilizado para ensinar as técnicas para extração de RNA e DNA, além da realização de etapas imprescindíveis para a análise genética. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. José Guilherme Xavier por ajudar nas análises histopatológicas, pela paciência de me ensinar sobre as avaliações de intestino, útero e ovário e o envio de bibliografia, além da confiança depositada em mim por ter aceitado me orientar no estágio de docência. Meu muito obrigado.

A Profa. Dra. Maria Martha Bernardi, pelo apoio financeiro do material para realização das análises, a todo ensinamento e confiança que sempre depositou em mim, desde a Iniciação Científica. Sempre serei grata por tudo.

Aos alunos do Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, especialmente a Dr. Marcella Galvão, minha parceira nesse projeto. Obrigada pela sua dedicação, parceria e ajuda que foram essenciais. As alunas de Iniciação Científica Vanessa Ancim e Tiffany Rocha, por todo auxílio e empenho depositado. Ao mestrando Daniel Lago, pela disponibilidade, gentileza e ajuda em várias etapas do projeto, além da amizade e parceria. Gratidão. A participação de vocês foi crucial para realização do projeto.

Agradeço ao Bruno e a Suzana pela colaboração na parte técnica e por serem sempre solícitos e atenciosos. Agradeço a Universidade Paulista e a Vice-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação pela infraestrutura disponibilizada para a realização dos experimentos, bem como pelos ótimos profissionais que me auxiliaram, em especial o técnico Wilton, sempre impecável em seu trabalho e ao Paulo, técnico de Patologia, pela confecção das lâminas de histologia.

Agradeço a CAPES-PROSUP também pelo apoio financeiro em forma de bolsa; auxílio fundamental para a execução deste curso.

Ao Prof. Dr. Fábio Rodrigues do Departamento de Química Fundamental do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), muito obrigada pelas dúvidas tiradas sobre

a cristalização da lactose. Sem sua ajuda e toda gentileza, não teríamos solucionado esse problema. Gratidão!

Agradeço em especial os animais do biotério, os ratos Wistar, esses heróis da ciência. Sem eles a ciência jamais teria avançado tanto.

A professora e mentora Dra. Flora Cordeiro que inicialmente confiou em mim e deu o primeiro empurrão para minha vida acadêmica. Foi um prazer imenso ter sido sua aluna na graduação e pelas parcerias na Iniciação Científica e Mestrado. Agradeço por ter se tornado uma amiga e estar sempre a disposição em me ajudar. Muito obrigada!

Agradeço imensamente aos meus pais Iara e Roberto, que sempre me apoiaram em tudo, que seguraram e seguram as pontas. Sem vocês nada disso seria possível. Sempre foram minha base em momentos de instabilidade que vivi. Cada passo que dou é sempre pensamento em vocês. São os únicos que sempre estiveram ao meu lado em tudo e que viram de perto tudo que passei até aqui, nesse caminho árduo. Amo vocês!

Ao Candinho por todo amor e carinho, por sempre me confortar em momentos angústia e ser tão importante na minha vida.

Ao meu namorado e amor Bruno Reinbrecht Meneghetti Rodrigues, que apesar de estar apenas na etapa final, me apoia, ouve minhas reclamações e desespero. Obrigada por ser meu conforto nesse momento, por sempre enaltecer meu trabalho e ressaltar que eu sempre devo valorizar tudo o que eu faço. Por sempre mostrar entusiasmo por eu estar fazendo algo importante. Te amo!

RESUMO

GALVÃO, N. A. **Caracterização comportamental e fisiopatológica reprodutiva e de trato digestório em modelo murino de intolerância à lactose.** Tese (Doutorado em Patologia Ambiental e Experimental) - Universidade Paulista, São Paulo, 2023. 77 f. Orientação: Prof. Dr. Thiago B. Kirsten

A intolerância à lactose (IL) afeta muitas pessoas, com sintomas como diarreia e dor abdominal, mas seus mecanismos são desconhecidos. Mulheres são mais reportadas e têm sido descritas correlações com prejuízos psiquiátricos e reprodutivos. O objetivo do trabalho foi de avaliar se a IL induz prejuízos psiquiátricos e reprodutivos femininos, estudando mecanismos locais, sistêmicos e centrais. Foram desenvolvidos dois modelos experimentais de IL com o fornecimento de dietas ricas em lactose: solução com 14% de lactose e fórmula comercial de leite em pó para o uso infantil por 14 dias seguidos. Foram avaliados em ratas adultas: as cı́balas fecais, o peso corporal, o consumo das dietas, comportamentos relacionados à atividade motora e ansiedade, a morfologia (histopatologia e morfometria) de ı́rgãos reprodutivos e entérica e a expressão de genes-chave do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG) e intestinal. Os resultados revelaram que as concentrações superiores a 14% (50, 35 e 25%) de lactose cristalizaram e prejudicaram o consumo. A solução de 14% não apresentou alterações fı́sico-quı́micas e resultou em boa palatabilidade. Essa solução de lactose e a fórmula comercial prejudicaram a consistência das cı́balas fecais a partir do dia 4. O comportamento foi afetado: efeito ansiogênico. Foi verificada hipertrofia epitelial uterina e aumento na espessura do miométrio. O estudo entérico revelou infiltração linfoplasmocı́tica, linfangiectasia, fusão de vilosidades, arrasamento criptal, diminuição do número de enterócitos, aumento do número de linfócitos e diminuição da expressão gênica de triptofano hidroxilase (Tph)1. As expressões de GnRh, kisspeptina, receptores de progesterona, LH e FSH e do fator de ligação imunomodulador de progesterona 1 aumentaram. Concluindo, ambas as dietas (lactose 14% e fórmula comercial) revelaram-se eficientes como modelos experimentais de IL. A hipótese que associa a IL com a maior prevalência a distúrbios psiquiátricos foi corroborada pelos achados de ansiedade e explicada pela diminuição da expressão de Tph1 intestinal com conseqüente prejuízo em vilosidades e criptas. A hipótese que associa a IL a prejuı́zos reprodutivos foi corroborada por achados morfológicos uterinos. O eixo HHG demonstrou-se chave na interface da IL com a reprodução, com modulação de genes de proteínas, hormônios e de seus receptores. A fórmula comercial induziu efeitos mais marcantes. Este trabalho abre perspectivas no diagnóstico e no tratamento de pacientes com IL, inclusive para comorbidades psiquiátricas e reprodutivas.

Palavras-chave: Diarreia; Modelo experimental; Reprodução; Ratos; Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal; Intestino.

ABSTRACT

GALVÃO, N. A. **Behavioral and reproductive and digestive tract pathophysiological characterization in a murine model of lactose intolerance.** PhD Thesis (Environmental and Experimental Pathology) - Paulista University, São Paulo, 2023. 77 p. Advisor: Prof. Dr. Thiago B. Kirsten

Lactose intolerance (LI) affects many people, with symptoms such as diarrhea and abdominal pain. The mechanisms have not yet been elucidated. Women are more frequently reported as LI and correlations with psychiatric and reproductive impairments have been described. The aim of the study was to evaluate whether LI induces psychiatric and reproductive impairments in females, searching for local, systemic, and central mechanisms. Two experimental LI models were developed by providing diets rich in lactose for 14 consecutive days: a solution containing 14% lactose and a commercial powdered milk formula for infant use. Adult female rats were evaluated for stool consistency, body weight, diet intake, behaviors related to motor activity and anxiety, reproductive and enteric organ morphology (histopathology and morphometry), and the expression of key genes of the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis and the intestine. Results revealed that concentrations greater than 14% (50, 35, and 25%) of lactose crystallized and impaired the consumption. The 14% lactose solution did not result physical-chemical changes and had good palatability. This lactose solution and the commercial formula impaired the stool consistency from day 4 onwards. Behavior was affected: anxiogenic effect. The uterine and ovarian study revealed epithelial hypertrophy, cellular debris, and increased myometrium thickness. The enteric study revealed leukocyte infiltration, lymphatic distension, fusion of villi, reduced crypt depth, reduced enterocytes count, increased lymphocytes count, and decreased gene expression of tryptophan hydroxylase (Tph)1. The expressions of GnRh, kisspeptin, progesterone, LH, and FSH receptors and progesterone immunomodulatory binding factor 1 increased. In conclusion, both diets (14% lactose and commercial formula) were efficient as rat models of LI. The hypothesis that associates LI with a higher prevalence of psychiatric disorders was corroborated by the findings of anxiety induction and explained by the decreased Tph1 expression in the intestine with consequent injure to villi and crypts. The hypothesis that associates LI with reproductive impairment was corroborated by uterine morphological findings. The HPG axis played a key role in the interface between LI and reproduction, with modulation of protein, hormones, and receptors genes. The commercial formula induced more robust effects. This study presented novel perspectives in the diagnosis and treatment of patients with LI, including with regard to psychiatric and reproductive comorbidities.

Keywords: Diarrhea; Experimental model; Reproduction; Rats; Hypothalamic-pituitary-gonadal axis; Intestine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Sistema encéfalo-intestino-microbioma.** Modulação bidirecional entre o sistema nervoso e o sistema gastrointestinal, com destaque para o papel da microbiota, fatores genéticos, imunes e ambientais 19
- Figura 2 – Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal.** (GnRH) hormônio liberador de gonadotrofinas, (LH) hormônio luteinizante (FSH) hormônio folículo-estimulante e (Pibf1) fator de ligação imunomodulador de progesterona 1 21
- Figura 3 – Confeção das soluções no Experimento 1.** Confeção das soluções de lactose no Experimento 1. (A) Processo de confeção e agitação da solução de lactose 50% realizada no Teste 1; (B) Solução de lactose 50% pronta no bebedouro (Teste 3); (C) Processo de confeção da solução de lactose 35% com aquecimento em banho-maria, realizada no Teste 4 32
- Figura 4 – Delineamento experimental do Experimento 2.** Delineamento experimental do Experimento 2, incluindo a cronologia dos dias de exposição às dietas ricas em lactose, o monitoramento dos sinais clínicos, a avaliação comportamental e as análises *post-mortem* 34
- Figura 5 – Soluções de lactose e cíbalas fecais no Experimento 1.** Observação das soluções de lactose, consumo da solução e cíbalas fecais dos ratos no Experimento 1. (A) Sedimentação da lactose (50%) no fundo do Becker observada imediatamente após o término da agitação, realizada no Teste 1; (B) Solução (50%) completamente diluída observada imediatamente após sua confeção (Teste 2, com aquecimento); (C) Obstrução parcial do bucal do bebedouro, observada no Teste 2; (D-E) Obstrução total do bucal do bebedouro, observada no Teste 3; (F) Obstrução parcial do bucal do bebedouro, observada no Teste 4; (G) Cíbalas fecais com consistência normal, observadas 24 horas após a confeção da solução do Teste 5; (H) Cristalização da lactose e obstrução total do bucal do bebedouro, observado 48 horas após a confeção da solução do Teste 5; (I) Cíbalas fecais com consistência normal, observado 48 horas após a confeção da solução do Teste 5; (J) Sedimentação da lactose (14%) observada no Teste 6 (sem aquecimento); (K) Solução (14%) completamente diluída, observada imediatamente após a confeção da solução do Teste 7; (L) Não houve cristalização da solução 24 horas após sua confeção (Teste 7); (M) Cíbalas fecais com consistência normal, observadas 24 horas após a confeção da solução do Teste 7; (N) Solução (14%) sem evidências de cristalização, observada 48 horas após a confeção (Teste 7); (O) Cíbalas fecais com aspecto esbranquiçado (Teste 7, 48 horas); (P) Solução (14%) sem evidências de cristalização, observada 72 horas após a confeção (Teste 7); (Q) Cíbalas fecais com consistência normal (Teste 7, 72 horas); (R) Solução (14%) sem evidências de cristalização, observada 96 horas após a confeção (Teste 7); e (S) Solução (14%) sem evidências de cristalização, observada 168 horas após a confeção (Teste 7), também sem alterações com relação a cor, viscosidade e odor 45
- Figura 6 – Monitoramento dos sinais clínicos.** Efeitos de dietas ricas em lactose (lactose 14% e fórmula comercial) ao longo de 14 dias quanto ao (A) peso corporal, (B) consumo das dietas (soluções) e (C) escore de cíbalas fecais em ratas adultas. As avaliações ocorreram a cada 48h: dias (d) 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 (n = 8 ratas/grupo). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ (ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Sidak ou teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn). Diferentes símbolos representam diferenças encontradas entre os grupos: (\$) lactose vs. controle, (#) fórmula vs. controle e (%) lactose vs. fórmula. Os resultados são expressos como média e respectivos erros-padrão 48
- Figura 7 – Comportamento.** Efeitos de dietas ricas em lactose (lactose 14% e fórmula comercial) ao longo de 14 dias quanto a comportamento de ratas adultas relacionados a atividade motora e a ansiedade: (A) frequência de levantar, (B) frequência de cruzamentos entre compartimentos, (C) tempo de permanência no compartimento central, (D) tempo de locomoção nos compartimentos periféricos e (E) tempo de locomoção no compartimento central. As avaliações ocorreram no último dia de exposição às dietas (n = 8 ratas/grupo). * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ (ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey ou teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn). Os resultados são expressos como média e respectivos erros-padrão e *box & whiskers*, mostrando todos os valores 50

Figura 8 – Histopatologia uterina e ovariana. Efeitos de dietas ricas em lactose (lactose 14% e fórmula comercial) ao longo de 14 dias quanto à histopatologia uterina e ovariana de ratas adultas em fase lútea. As avaliações ocorreram no dia seguinte ao último dia de exposição às dietas (n = 4-6 ratas/grupo). Fotomicrografia de cortes histológicos do útero, hematoxilina-eosina, do (A e B) grupo controle, (C e D) grupo lactose e (E e F) grupo fórmula; (seta) infiltração leucocitária mista em lâmina própria, com predomínio linfoplasmocítico e ocasionais eosinófilos; (ponta de seta) hipertrofia epitelial; e (asterisco) debris celulares. Barra de escala = 10 µm..... 52

Figura 9 – Morfometria uterina e ovariana. Efeitos de dietas ricas em lactose (lactose 14% e fórmula comercial) ao longo de 14 dias quanto à morfometria uterina e ovariana de ratas adultas em fase lútea. As avaliações ocorreram no dia seguinte ao último dia de exposição às dietas (n = 4-6 ratas/grupo). Fotomicrografia de cortes histológicos (hematoxilina-eosina) do útero (A) do grupo controle, (B) do grupo lactose e (C) do grupo fórmula; e do ovário (F) do grupo controle, (G) do grupo lactose e (H) do grupo fórmula; (e) endométrio, (m) miométrio e (cl) corpos lúteos. Barra de escala = 100 µm. Análises estatísticas e representações gráficas (D) da espessura do endométrio, (E) da espessura do miométrio, (I) do diâmetro dos corpos lúteos e (J) da frequência de corpos lúteos. * $p < 0.05$ (ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey ou teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn). Os resultados são expressos como média e respectivos erros-padrão e *box & whiskers*, mostrando todos os valores 54

Figura 10 – Histopatologia entérica. Efeitos de dietas ricas em lactose (lactose 14% e fórmula comercial) ao longo de 14 dias quanto à histopatologia entérica de ratas adultas. As avaliações ocorreram no dia seguinte ao último dia de exposição às dietas (n = 8 ratas/grupo). Fotomicrografia de cortes histológicos do intestino delgado, hematoxilina-eosina, do (A e B) grupo controle, evidenciando vilosidades preservadas, revestimento superficial contínuo por enterócitos e células caliciformes e discreta população leucocitária em lâmina própria; (C) grupo lactose, evidenciando achatamento e fusão de vilosidades, presença de infiltrado leucocitário misto em lâmina própria, com predomínio linfoplasmocítico (seta) e distensão linfática focal; (D) grupo lactose, com distensão linfática em vilosidade e célula endotelial linfática (seta); (E) grupo lactose, com discreta expansão linfóide em placa de Peyer; (F) grupo fórmula, com achatamento e fusão de vilosidades, presença de infiltrado leucocitário misto em lâmina própria, com predomínio linfoplasmocítico (seta) e distensão linfática focal; (G) grupo fórmula, com distensão linfática em vilosidade (seta); (H) grupo fórmula, com discreta expansão linfóide em placa de Peyer. Barra de escala = 100 µm (A) e 20 µm (B-H) 56

Figura 11 – Morfometria entérica. Efeitos de dietas ricas em lactose (lactose 14% e fórmula comercial) ao longo de 14 dias quanto à morfometria entérica de ratas adultas. As avaliações ocorreram no dia seguinte ao último dia de exposição às dietas (n = 6 ratas/grupo). Fotomicrografia de cortes histológicos (hematoxilina-eosina) do intestino delgado (A) do grupo controle, (B) do grupo lactose e (C) do grupo fórmula; (v) vilosidade e (c) cripta. Barra de escala = 100 µm. Análises estatísticas e representações gráficas de (D) altura das vilosidades, (E) profundidade das criptas e (F) índice vilosidade-cripta, (G) contagem de enterócitos, (H) contagem de linfócitos e (I) contagem de células caliciformes. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ (ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey ou teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn). Os resultados são expressos como média e respectivos erros-padrão e *box & whiskers*, mostrando todos os valores..... 58

Figura 12 – Expressão de genes-chave do eixo HHG e intestinal. Efeitos de dietas ricas em lactose (lactose 14% e fórmula comercial) ao longo de 14 dias quanto a expressão de genes-chave do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e intestinal em ratas adultas: (A) GnRh, (B) receptor da progesterona, (C) kisspeptina, (D) receptor da kisspeptina, (E) receptor do LH, (F) receptor do FSH, (G) fator de ligação imunomodulador de progesterona (Pibf)1 e (H) triptofano hidroxilase (Tph)1. As avaliações ocorreram no dia seguinte ao último dia de exposição às dietas (n = 7 ratas/grupo). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ (ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey ou teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn). Os resultados são expressos como média e respectivos erros-padrão e *box & whiskers*, mostrando todos os valores..... 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Metodologia do Experimento 1. Protocolos metodológicos dos sete testes realizados no Experimento 1 com diferentes concentrações de lactose e variações de confecção (temperatura e agitação).....	31
Tabela 2 – Iniciadores específicos para a expressão gênica. Sequências de iniciadores específicos para o estudo da expressão gênica e condições de ciclagem da reação em cadeia da polimerase quantitativo em Tempo Real (q-PCR).....	40
Tabela 3 – Resultados do Experimento 1. Resultados obtidos nas avaliações diárias realizadas em todos os protocolos experimentais (Testes 1 a 7) do Experimento 1. Estão descritas informações relativas à solubilização da amostra, aspectos relativos à viscosidade, cor e odor, consumo da solução pelos ratos e, aspectos gerais da saúde dos ratos.....	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
1.1 Consumo de leite e intolerância à lactose	14
1.2 Intolerância à lactose e ansiedade	17
1.3 Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal.....	20
1.4 Intolerância à lactose e aspectos relacionados à reprodução	22
1.5 Modelos de intolerância à lactose em animais de laboratório	25
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Declaração de ética	28
3.2 Animais	28
3.3 Experimento 1	29
3.3.1 Padronização da solução de lactose.....	29
3.3.2 Consumo e aspectos de saúde para definição da solução de lactose	30
3.4 Experimento 2	32
3.4.1 Tratamentos, grupos e delineamento experimental	32
3.4.2 Monitoramento de sinais clínicos	34
3.4.3 Comportamento: atividade motora e ansiedade.....	35
3.4.4 Histopatologia uterina e ovariana	36
3.4.5 Morfometria uterina e ovariana	36
3.4.6 Histopatologia entérica	37
3.4.7 Morfometria entérica	37
3.4.8 Expressão de genes-chave do eixo HHG e intestinal	38
3.5 Análises estatísticas	41
4. RESULTADOS	42
4.1 Experimento 1	42
4.2 Experimento 2	46
4.2.1 Monitoramento de sinais clínicos	46
4.2.2 Comportamento: atividade motora e ansiedade.....	49
4.2.3 Histopatologia uterina e ovariana	51
4.2.4 Morfometria uterina e ovariana	53
4.2.5 Histopatologia entérica	55
4.2.6 Morfometria entérica	57
4.2.7 Expressão de genes-chave do eixo HHG e intestinal	59
5. DISCUSSÃO	61
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
REFERÊNCIAS	68
ANEXOS.....	77
Anexo 1 – Certificado CEUA/UNIP	77

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Esta seção aborda assuntos disponíveis na literatura especializada relacionados ao consumo de leite, a intolerância à lactose, a relação entre a ansiedade e a intolerância à lactose, o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG), aspectos relacionados à reprodução na intolerância à lactose e modelos de intolerância à lactose em animais de laboratório. Assim, os assuntos que foram estudados experimentalmente neste trabalho são introduzidos e justificados nesta seção.

1.1 Consumo de leite e intolerância à lactose

O primeiro alimento que um mamífero recebe é o leite materno, substância produzida nas glândulas mamárias das fêmeas. A composição do leite materno varia dentre as espécies, mas, de forma sucinta, é um fluído viscoso, de cor esbranquiçada, composto por macronutrientes como carboidratos (especialmente a lactose), proteínas, lipídios, vitaminas (A, D, B9 e B12, entre outras), e minerais (como cálcio, potássio, sódio, magnésio e selênio), além de compostos bioativos e elementos interativos, como fatores de crescimento, hormônios, citocinas, quimiocinas, entre outros fatores de regulação (MOSCA; GIANNI, 2017; FOROUTAN et al., 2019). Alimento balanceado para o recém-nascido, o leite materno tem também como função proteger seu trato intestinal, fornecer células para produção de anticorpos e desenvolver o metabolismo, incluindo a regulação da produção de glicose e insulina (PALMEIRA; CARNEIRO-SAMPAIO, 2016; WITKOWSKA-ZIMNY; KAMINSKA-EL-HASSAN, 2017). Portanto, o consumo do leite é considerado um importante aliado para o fornecimento de nutrientes e para a manutenção da saúde.

A concentração de lactose no leite materno varia entre as espécies. Destaca-se que o ser humano possui 6,9-7,2% de lactose em seu leite (FOX; MCSWEENEY, 1998; PASTUSZKA; BARLOWSKA; LITWINCZUK, 2016), enquanto que o leite de vaca possui 4,6-4,8% de lactose (FOX; MCSWEENEY, 1998; ALVES DA CUNHA et al., 2020) e os ratos possuem somente 1,1-2,6% de lactose no seu leite (FOX; MCSWEENEY, 1998).

Durante o período de amamentação, o recém-nascido produz a lactase (beta-galactosidase) no trato digestivo, enzima capaz de atuar no processo de degradação da lactose por hidrólise, a fim de quebrar as moléculas em D-glicose e D-galactose para absorção dos nutrientes (KRUTTLI et al., 2014; MOSCA; GIANNI, 2017). Recém-nascidos têm lactase suficiente para digerir cerca de um litro de leite materno por dia (HEINE et al., 2017). Após o

período de amamentação, deve ocorrer naturalmente o declínio da produção enzimática de lactase pelo intestino delgado, pois em condições naturais, os mamíferos crescidos não ingerem mais leite. Esse declínio dos níveis de lactase após o desmame é chamado de não persistência de lactase (LNP, sigla do inglês) (HEINE et al., 2017). Entretanto, seres humanos mantêm o consumo do leite e de seus derivados, no caso, substituindo o leite materno por aquele produzido por outros mamíferos, como vaca e cabra (PERINO et al., 2009).

O consumo humano de leite de outras espécies ocorre há milhares de anos. Coincide com o período da revolução agrícola, onde os *homo sapiens* iniciaram um movimento no sentido de deixarem de serem caçadores-coletores, com hábitos nômades, para viverem em assentamentos permanentes, domesticando espécies vegetais e animais. Existem evidências de cerca de 7.000 anos antes de cristo (a.c.) onde foram encontrados resíduos orgânicos preservados em cerâmica arqueológica associado a criação de gado, isto é, existe consumo de leite de gado por humanos há mais de 9 mil anos (EVERSHED et al., 2008). Acredita-se que na Era Neolítica, com a domesticação e criação de gado, além do consumo de carne e pele, o leite era um importante aliado no fornecimento de gordura e carboidratos, auxiliando na obtenção de energia em uma época de escassez (GERBAULT et al., 2011). Em localidades de clima árido, o leite podia ser a única fonte de hidratação não contaminada (COOK; ALTORKI, 1975).

O constante consumo humano de leite proveniente de outras espécies ao longo dos milênios permitiu favorecer a seleção de mutações no material genético de algumas populações, no sentido de manter a produção da enzima lactase mesmo após a infância (SIBLEY, 2004). Assim, algumas pessoas apresentam altos níveis de atividade da lactase mesmo na idade adulta. A persistência hereditária da lactase é comum principalmente em pessoas de descendência do norte da Europa e é atribuída à herança de uma mutação autossômica dominante que impede o declínio maturacional na expressão da lactase (SIBLEY, 2004). Pelo menos cinco populações humanas em todo o mundo já desenvolveram mutações independentes que regulam a expressão do gene da lactase-clorizina-hidrolase. Essas mutações resultam em um fenótipo de persistência da lactase dominante e tolerância contínua à lactose na idade adulta (KRUTTLI et al., 2014). Existem algumas hipóteses de como ocorreu a mutação do gene de persistência à lactase. A hipótese histórico-cultural postula que o alelo de persistência a lactase surgiu a partir da seleção em culturas com uma longa história de alimentação com laticínios. Já a hipótese de causa inversa sustenta que o alelo de persistência à lactase pode já ter sido comum em certas populações devido à deriva

genética e somente essas populações teriam adotado a prática cultural de criação de leite (NEI; SAITOU, 1986).

Por outro lado, o declínio maturacional na atividade da lactase torna o indivíduo intolerante ao consumo de leite e seus derivados em diferentes gradientes. Em condições de deficiência primária ou secundária de lactase, os açúcares de lactose no leite passam pelo trato gastrointestinal não digeridos ou são parcialmente digeridos por enzimas produzidas pela microbiota bacteriana intestinal, produzindo ácidos graxos de cadeia curta, hidrogênio, dióxido de carbono e metano. As moléculas de lactose não digeridas e os produtos da digestão bacteriana podem resultar em sintomas de intolerância à lactose, como diarreia, inchaço de gás, flatulência e dor abdominal (SIBLEY, 2004; DENG et al., 2015). Assim, intolerância à lactose é definida como sinais decorrentes da exposição à lactose em animais que tem redução ou ausência de lactase (MISSELWITZ et al., 2019). A intolerância à lactose é um tipo de intolerância causada por interações no eixo genoma-dieta e pode ser subdividida em dois tipos de condições de acordo com os níveis de atividade da lactase: alactasia (total ausência de atividade da lactase) e hipolactasia (atividade da lactase em níveis muito baixos na mucosa jejunal, com desbalanço entre a quantidade de lactose ingerida e a habilidade de hidrólise) (UGIDOS-RODRIGUEZ; MATAALLANA-GONZALEZ; SANCHEZ-MATA, 2018). A intolerância à lactose depende não apenas da expressão da lactase, mas também da dose de lactose, microbiota intestinal, motilidade gastrointestinal, supercrescimento bacteriano no intestino delgado e sensibilidade do trato gastrointestinal à geração de gás e outros produtos fermentativos da digestão da lactose (DENG et al., 2015).

Indivíduos que sofrem da intolerância à lactose tendem a evitar uma dieta rica em lactose, mas esses alimentos são importantes para uma dieta saudável. Dietas pobres em leite e seus derivados são fatores de risco para baixa densidade óssea e desenvolver osteoporose (SAVAIANO, 2011). O tratamento da intolerância à lactose pode incluir dieta restritiva em lactose e reposição enzimática (PERINO et al., 2009; DENG et al., 2015).

Estima-se que 70% da população mundial adulta sofram da não persistência de lactase/hipolactasia primária do adulto, que é a causa fisiológica primária da intolerância à lactose (CRAMER; XU; SAHI, 1994; HEINE et al., 2017). A intolerância à lactose pode ocorrer ainda de forma congênita, situação extremamente rara, ou, secundariamente, a partir de processos inflamatórios no intestino, como pacientes com doença de Crohn, doença do intestino irritável, doença celíaca, bem como em bebês com giardíase e outras gastroenterites virais; estados esses temporários (HEINE et al., 2017). Aliás, a intolerância à lactose

geralmente não se manifesta clinicamente antes dos cinco anos de idade, com exceção quando dessas parasitoses (HEINE et al., 2017).

Os idosos e as mulheres são mais reportados como acometidos pela intolerância à lactose (BAADKAR; MUKHERJEE; LELE, 2014; LAPIDES; SAVAIANO, 2018). Existem estudos demonstrando que a partir dos 65 anos de idade, o idoso desenvolve má absorção dos derivados do leite devido ao declínio na produção das enzimas intestinais, mas ainda são necessários mais estudos para desvendar os mecanismos (DI STEFANO et al., 2001). A explicação para a maior predisposição do sexo feminino quanto à intolerância à lactose não foi descrita, embora se tenha demonstrado menor concentração de certas imunoglobulinas (IgG4) bem como possível correlação com outros hormônios e mediadores imunes (CARBALLO et al., 2016). Porém, considera-se que a intolerância à lactose parece não ter correlação direta com sistema imune, visto que não é uma resposta de imunoglobulina E (IgE), mas de uma deficiência da síntese da enzima lactase para que ocorra o processo de degradação da lactose (PERINO et al., 2009).

1.2 Intolerância à lactose e ansiedade

Aparentemente, existe uma relação entre pacientes com intolerância à lactose e maior predisposição a distúrbios psiquiátricos, como a ansiedade e a depressão. Porém, os relatos são escassos e/ou inconclusivos. Em um estudo experimental com mulheres voluntárias saudáveis que receberam dose oral de 50 g de lactose, seis das 24 voluntárias foram classificadas como intolerantes à lactose após o tratamento. Nessas voluntárias houve aumento significativo nos valores de questionários validados para avaliar depressão, revelando correlação entre a má absorção de lactose e quadros de depressão (LEDOCHOWSKI; SPERNER-UNTERWEGER; FUCHS, 1998). A explicação para essa relação estaria no fato de a ingestão de lactose em indivíduos que não possuem persistência de lactase levaria a um processo inflamatório que acarretaria no comprometimento da disponibilidade de L-triptofano, afetando a atividade do sistema serotoninérgico (5-hidroxitriptamina, 5-HT), o qual sabidamente está intimamente ligado com transtornos de humor (LEDOCHOWSKI; SPERNER-UNTERWEGER; FUCHS, 1998). Aliás, as mulheres produzem menos L-triptofano do que os homens (ELLENBOGEN et al., 1996).

Por falar nisso, a serotonina é um neurotransmissor monoaminérgico sintetizado em neurônios serotoninérgicos do sistema nervoso central e em órgãos periféricos presentes no

epitélio gastrointestinal (BONOMAULLY et al., 2014). A concentração de serotonina periférica é regulada pela enzima triptofano hidroxilase (Tph) que possui duas isoformas (WALTHER; BADER, 2003). A Tph1 é a enzima limitante da taxa de biossíntese de serotonina, expressa predominantemente em órgãos periféricos, especialmente células enterocromafins no intestino, glândula pineal e baço. A Tph2 é expressa principalmente no nervo entérico e neurônios centrais (LI, Z. et al., 2011). Sabe-se que a concentração disponível de serotonina é 5% fornecida pelo encéfalo e 95% produzida nos órgãos periféricos (SNARSKA et al., 2021). A deficiência de serotonina, a falta de seus transportadores, receptores ou enzimas da via serotoninérgica estão associadas a muitas doenças incluindo doenças psicossomáticas como a depressão e ansiedade (SERRETTI; DRAGO; DE RONCHI, 2007).

Além do estudo experimental citado com mulheres voluntárias revelando a correlação entre intolerância à lactose e depressão, existem evidências indiretas da associação de disfunções gastrointestinais e a ansiedade. Existe uma alta comorbidade descrita entre pacientes que tem a síndrome do intestino irritável e ansiedade (FOND et al., 2014). A síndrome do intestino irritável se caracteriza por sinais clínicos como diarreia, dores abdominais e prisão de ventre (FORD, 2009). No caso, fatores psicológicos são moderadores importantes da gravidade dos sintomas, persistência dos sintomas, decisões de procurar tratamento e resposta ao tratamento na síndrome do intestino irritável (LEE et al., 2009). Os mecanismos estão relacionados com a modulação bidirecional entre o sistema nervoso e o sistema gastrointestinal, chamado de sistema encéfalo-intestino-microbioma (**Figura 1**).

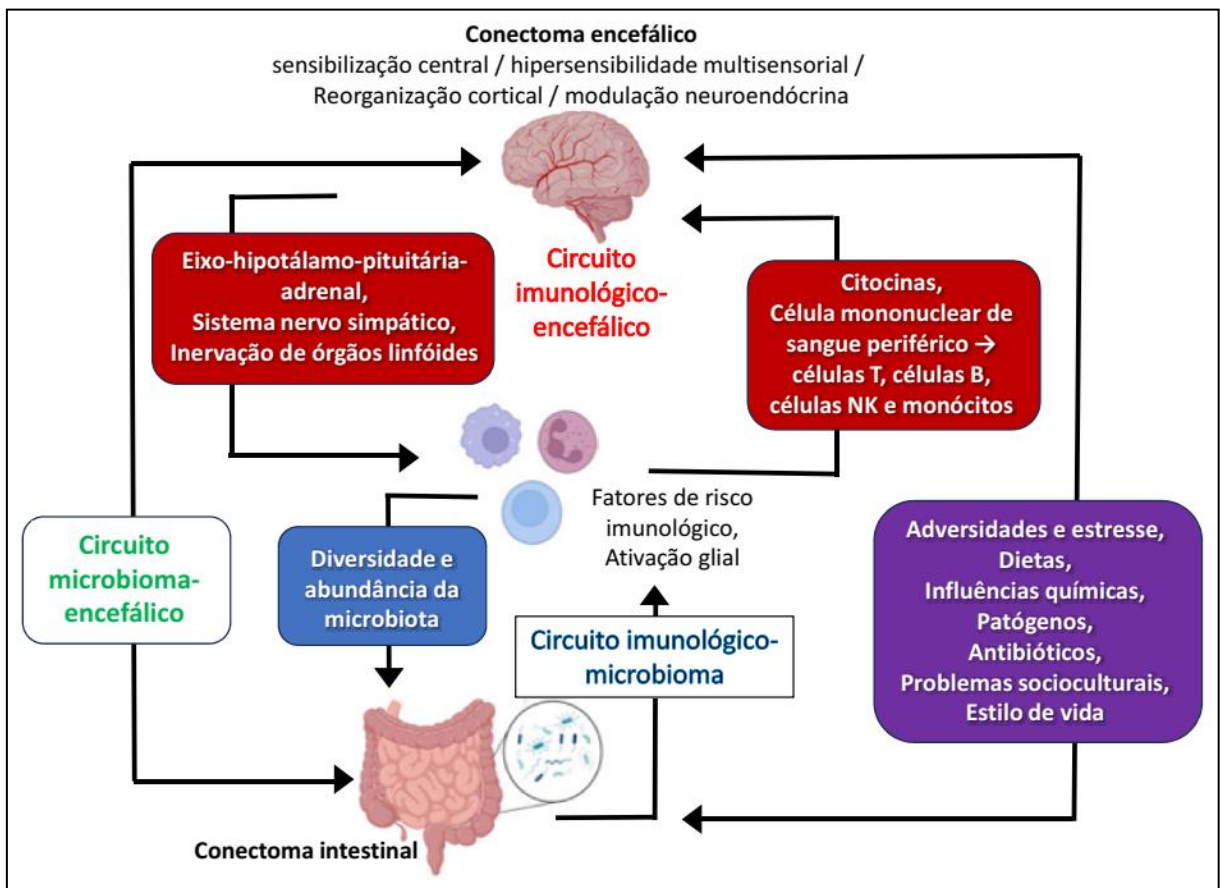
Além disso, pacientes com gastroenterite apresentam significativamente pontuações mais altas para ansiedade, depressão e traço neurótico do que aqueles com função intestinal normal (ZAMANI; ALIZADEH-TABARI; ZAMANI, 2019). A doença inflamatória intestinal também apresenta alta comorbidade para transtornos de ansiedade (GWEE et al., 1996).

Ao considerar que a intolerância à lactose pode estar associada a maior predisposição a distúrbios psiquiátricos, estudos prévios de nosso laboratório aplicaram em ratos e ratas os dois modelos experimentais de dietas ricas em lactose propostos e aplicados no presente estudo e avaliaram testes comportamentais associados a socialização e a depressão 15 dias após o início da exposição às dietas (GALVAO, 2023). Os resultados encontrados no teste de preferência social revelaram que ambas as dietas ricas em lactose reduziram a interação social dos ratos, sendo o efeito mais pronunciado aquele causado pela fórmula comercial; efeito não observado nas ratas. O teste do nado forçado revelou que nenhuma das dietas ricas em lactose

afetou parâmetros relacionados ao comportamento tipo-depressivo. Observou-se somente um efeito quanto a diferenças entre os gêneros, onde os machos ficaram mais imóveis que as fêmeas.

Para o presente trabalho, os estudos foram continuados, avaliando agora a eventual relação entre a intolerância à lactose e a ansiedade e entender os mecanismos centrais e gastrointestinais relacionados.

Figura 1 – Sistema encéfalo-intestino-microbioma. Modulação bidirecional entre o sistema nervoso e o sistema gastrointestinal, com destaque para o papel da microbiota, fatores genéticos, imunes e ambientais



Fonte: adaptado de Mayer, Ryu e Bhatt (2023)

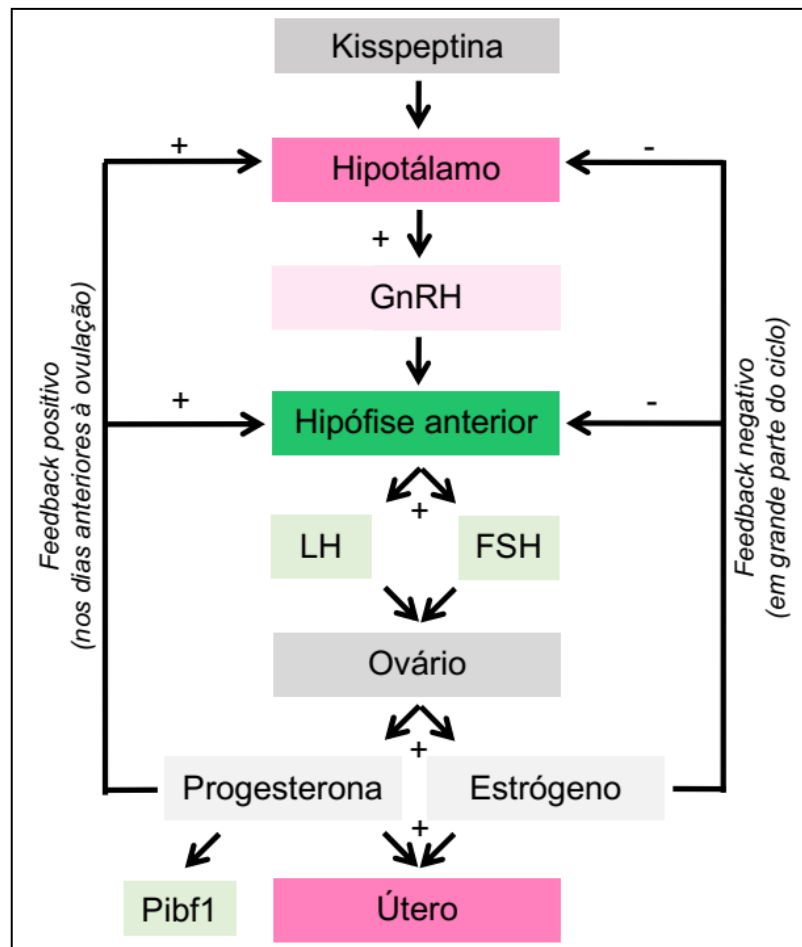
Por falar em intolerância à lactose e microbiota intestinal, sabe-se que alguns tipos de bactérias são capazes de metabolizar a lactase com eficácia, melhorando a digestão e a tolerância à lactose. A modulação da microbiota intestinal tem sido relatada como um importante aliado aos intolerantes à lactose. Um estudo realizado com modulação da

microbiota intestinal, utilizando probiótico galacto-oligossacarídeo (com 95% de pureza) demonstrou resultados significativos na redução de sinais clínicos dos indivíduos intolerantes. Foi observado um aumento expressivo de bactérias *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* e *Lactobacillus*. No estudo os indivíduos intolerantes à lactose consumiram galacto-oligossacarídeo por 36 dias, sem consumo de lactose nesse período. Após esse período, foi introduzida a dieta com lactose por mais 30 dias e posteriormente foram avaliados na escala de Likert. O estudo revelou que os indivíduos melhoraram o quadro de intolerância à lactose, demonstrando assim a importância da modulação da microbiota intestinal nesses casos de intolerantes à lactose (AZCARATE-PERIL et al., 2017).

1.3 Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal

A reprodução é necessária para a perpetuação da espécie e o sucesso reprodutivo depende de muitos neuropeptídeos e sistemas hormonais trabalhando em conjunto para regular a função gonadal e o comportamento sexual. A reprodução dos mamíferos é orquestrada pelo eixo HHG, também conhecido como eixo hipotálamo-pituitária-gonadal (HPG) (ACEVEDO-RODRIGUEZ et al., 2018). O controle hipotalâmico da reprodução é coordenado por meio da liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) dos neuroterminais na eminência mediana para um sistema capilar, atuando como um portal entre o hipotálamo e a hipófise. O GnRH por sua vez, se liga nos receptores nos gonadotrofos da hipófise (pituitária) anterior e estimula a secreção de gonadotrofinas, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH) na circulação (CHRISTENSEN et al., 2012). Esses hormônios funcionam nas gônadas para estimular a produção de gametas e promover a liberação gonadal de esteroides sexuais, como a testosterona, o estradiol e a progesterona (ACEVEDO-RODRIGUEZ et al., 2018). Nas fêmeas, as gonadotropinas agem nos ovários para estimular a manutenção da gametogênese e esteroidogênese. Junto com a orientação da função reprodutiva nos tecidos periféricos, esses esteróides gonadais também podem retroalimentar e modular (mecanismos de *feedback*) componentes do eixo HHG (CHRISTENSEN et al., 2012; ACEVEDO-RODRIGUEZ et al., 2018). A **Figura 2** ilustra de maneira resumida o eixo HHG.

Figura 2 – Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. (GnRH) hormônio liberador de gonadotrofinas, (LH) hormônio luteinizante (FSH) hormônio folículo-estimulante e (Pibf1) fator de ligação imunomodulador de progesterona 1



Fonte: adaptado de Moreira (2015) e Ilahi e Haq (2021)

É importante mencionar que a funcionalidade do eixo HHG é extremamente similar comparando humanos e ratos, de modo que os ratos são ótimos modelos experimentais. No decorrer do proestro das ratas, enquanto os níveis de estradiol aumentam, o GnRH é liberado e provoca a liberação de LH que estimula a produção de progesterona nos ovários (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007). Os principais efeitos do estradiol na rede neuroglial, mediando o sistema GnRH, é induzir a expressão de receptores de progesterona (MICEVYCH; SINCHAK, 2011).

A progesterona é um hormônio esteróide envolvido no ciclo estral e na gravidez, produzida pelo corpo lúteo nos ovários após a ovulação e na glândula adrenal, assim como na placenta, durante a gravidez (CHRISTENSEN et al., 2012). O aumento nos níveis de progesterona indica que a ovulação ocorreu e os níveis de progesterona atingiram o pico na

fase lútea média do ciclo. Variações nos níveis desses hormônios é uma resposta ao funcionamento dos hormônios hipofisários no ovário (MICEVYCH; SINCHAK, 2011). A progesterona é capaz de modular diversas funções cerebrais através do vínculo com receptores específicos, no caso, o receptor A de progesterona (Pgr-A) e o receptor B de progesterona (Pgr-B) (CHEN, H. et al., 2020). Esses receptores esteróides gonadais estão presentes em diversas áreas encefálicas, como na amígdala, no hipocampo, córtex, cerebelo, locus cerúleos, núcleo da rafe do mesencéfalo, células gliais, hipófise e hipotálamo (ALONSO-SOLIS et al., 1996). O mecanismo de ação desses hormônios no encéfalo é semelhante ao observado nos órgãos alvo periféricos, incluindo os efeitos genômicos e não genômicos. Através do mecanismo genômico clássico, esteróides induzem ações mais lentas de longo prazo nos neurônios por ativação específica de receptores intracelulares que modulam a transcrição e sínteses e proteínas. Portanto esteróides gonadais modulam a síntese, liberação e metabolismo de muitos neuropeptídeos e transmissores neuroativos e a expressão de seus receptores (PANAY; STUDD, 1998). Em particular, entre os neurotransmissores, noradrenalina, dopamina, ácido- γ -aminobutírico (GABA), acetilcolina, serotonina e melatonina são regulados por hormônios sexuais esteróides. Muitos neuropeptídeos são modulados diretamente pelos hormônios gonadais incluindo peptídeos opioides, GnRH, fator liberador de corticotrofina (CRF), neuropeptídeos (NP) γ e galanina. Por outro lado, hormônios esteróides exercem efeitos muito rápidos que não podem ser atribuídos ao mecanismo genômico: por exemplo, o estrogênio, com excitabilidade elétrica moduladora de progesterona, funcionalidade sináptica e recursos morfológicos (MONG; MCCARTHY, 1999). A interação de mecanismos genômicos e não-genômicos permite que uma ampla gama de ações de esteróides sexuais na regulação da função cerebral.

1.4 Intolerância à lactose e aspectos relacionados à reprodução

Embora não tenha sido encontrado qualquer relato de prejuízos na reprodução da população masculina diagnosticada com intolerância à lactose, o cenário feminino é diferente. Além do fato já mencionado anteriormente de que a intolerância à lactose ser mais reportado no sexo feminino, existem estudos revelando prejuízos na sua esfera reprodutiva. São descritas evidências clínicas e experimentais que a galactose (que tem papel na síntese de lactose) pode ser tóxica para células germinativas ovarianas (CRAMER; XU; SAHI, 1994). Mulheres galactosêmicas (aquelas com pouca habilidade em converter galactose em glicose via enzima

galactose-1-fosfato uridil transferase) desenvolvem menopausa prematura (JIN; YU; HUANG, 2012). Camundongos fêmeas alimentadas com dieta contendo 50% de galactose desenvolvem disfunção ovulatória e mostram evidências de destruição de oócitos (SWARTZ; MATTISON, 1988). Ratas gestantes alimentadas com essa mesma dieta contendo 50% de galactose geram prole com número reduzido de oócitos (CHEN, Y. T. et al., 1981). Assim, mudanças na dieta de galactose devem prejudicar funções ovarianas (CRAMER; XU; SAHI, 1994).

Foi revelada também correlação entre a hipolactasia e índices de fertilidade idade-específicos. A fertilidade em idades mais avançadas é menor e o declínio da fertilidade com o envelhecimento é mais acentuado em populações com elevado consumo per capita de leite (e maior capacidade de digerir o seu componente lactose) (CRAMER; XU; SAHI, 1994). Os autores atestam ainda que o efeito nas funções ovarianas deva ser cumulativo.

Os mecanismos relacionados aos prejuízos reprodutivos quando de intolerância à lactose ainda estão longe de serem elucidados. Existem apenas evidências indiretas. A progesterona tem o potencial de exercer papel chave. Ela pode atuar na maturação da lactase em fetos humanos (SZILAGYI et al., 1996). Em ratos, doses elevadas de progesterona induzem lactase intestinal (NAGPAUL et al., 1990). Ademais, a progesterona aumenta a altura das vilosidades de ratos, expandindo assim a superfície da mucosa e a quantidade de lactase disponível, podendo influenciar em processos relacionados intolerância à lactose (SALOMON et al., 1996).

Em relação aos mecanismos moleculares implicados nos prejuízos reprodutivos, a epigenética parece exercer importante papel, uma vez que foi demonstrado seu envolvimento durante processo puberal feminino no controle da expressão de hormônios neuroendócrinos pelo hipotálamo (LOMNICZI; WRIGHT; OJEDA, 2015; LOMNICZI; OJEDA, 2016). A primeira evidência de que a expressão do GnRH poderia ser regulada epigeneticamente foi mostrado por Kurian e colaboradores (KURIAN; KEEN; TERASAWA, 2010) utilizando cultivo de neurônios GnRH de primatas. Neste trabalho, foi mostrado que a metilação da região promotora do gene diminuía em neurônios GnRH, coincidindo o aumento de sua expressão. Este estudo foi importante, pois deu início a um campo vasto de investigações a respeito do envolvimento dos mecanismos epigenéticos na biologia dos neurônios GnRH não apenas durante o desenvolvimento embrionário, mas também sob condições que possam adiantar ou atrasar a puberdade.

Em relação ao hipotálamo, estudos destacam a contribuição da epigenética em três níveis de regulação hipotalâmica: ao longo do desenvolvimento da rede neuronal GnRH; nos

neurônios da kisspeptina AVPV, responsáveis pelo aumento pré-ovulatório de gonadotrofinas; e em neurônios ARC KNDy, responsáveis pelo controle da secreção pulsátil de GnRH (TORO; AYLWIN; LOMNICZI, 2018). No ovário, foi demonstrado em modelo murino de síndrome de ovário policístico que a metilação da região promotora do gene do receptor de hormônio luteinizante foi perdida pela administração de desidroepiandrosterona (DHEA) (ZHU et al., 2010).

Aliás, a epigenética refere-se a modificações químicas na molécula do DNA que acabam por modificar a acessibilidade dos fatores de transcrição ao DNA pelo bloqueio de seus sítios de ligação e/ou pelo estado de compactação da cromatina, controlando assim diferentes padrões de expressão gênica (TORO; AYLWIN; LOMNICZI, 2018). A perda ativa de metilação do DNA é um processo enzimático que leva à remoção do metil grupo de 5-metilcitosina (5mC) por meio de oxidação sucessiva [5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC), 5-carboxilcitosina (5caC)] catalisada por translocação dez-onze Família (TET) (KOHLI; ZHANG, 2013). Cabe ressaltar ainda que já foi demonstrado em experimentos *in vitro* e *in vivo* que a enzima TET2 promove a transcrição e liberação de peptídeo de GnRH, promovendo a manutenção da função reprodutiva (KURIAN et al., 2016). No entanto, o envolvimento dos mecanismos epigenético na regulação da transcrição dos genes relacionados ao eixo HHG ainda não foi elucidado, especialmente frente ao quadro de intolerância à lactose.

A intolerância à lactose já foi correlacionada a maior susceptibilidade à síndrome dos ovários policísticos, por processos associados também ao consumo de cálcio, níveis baixos de andrógenos e níveis altos de HDL (*High Density Lipoproteins* ou lipoproteínas de alta densidade) (LERCHBAUM et al., 2012). Ainda existe muito a se estudar sobre a progesterona e o eixo HHG, como processos envolvidos na intolerância à lactose e prejuízos relacionados à reprodução feminina. Sabendo da possibilidade de que a epigenética sirva como um retransmissor de sinais ambientais modulando o desenvolvimento puberal, fica apoiada a aposta em seu envolvimento no controle da reprodução.

A kisspeptina regula o desenvolvimento das funções reprodutivas e o início da puberdade em humanos e em outros mamíferos, modulando o eixo reprodutivo (hipotálamo, hipófise e gônadas). A kisspeptina também está envolvida na regulação da invasão trofoblástica durante a gravidez, ovulação e hiperativação de espermatozoides (ILAHİ; HAQ, 2021). A modulação epigenética dos genes *kiss1* e *kiss1R* (seu receptor) dentro do hipotálamo no início da puberdade foi investigada em mulheres, fornecendo evidências de que a metilação de ambos genes promove mudanças ao longo da puberdade com o desenvolvimento

de um promotor diferencial específico altamente significativo de padrões de metilação (WYATT et al., 2013). Foi reportado também um mecanismo epigenético de repressão transcricional envolvendo o complexo de silenciamento polycomb (PCG), o qual previne o processo puberal prematuro em ratas (LOMNICZI et al., 2013).

1.5 Modelos de intolerância à lactose em animais de laboratório

Considerando a alta incidência da intolerância à lactose e seus efeitos crônicos que o paciente sofre, a ciência lança mão de modelos experimentais para buscar o entendimento dos mecanismos de ação envolvidos e terapias eficazes. Porém, infelizmente, até o momento, são poucos os estudos envolvendo modelos experimentais em roedores e a intolerância à lactose. Os poucos estudos publicados buscam principalmente mimetizar o principal sintoma da intolerância à lactose: a diarreia.

Um exemplo é o tratamento de camundongos Balb/c com altas doses de lactose: 25 g/60 kg de peso corporal (LI, J. et al., 2012). Nesse estudo, para detectar a intolerância à lactose, foi avaliado o índice de diarreia, incluindo a frequência de fezes e peso total de fezes seis horas após o desafio e a motilidade intestinal. Além disso, os camundongos foram tratados oralmente com *Lactococcus lactis* MG1363/FGZW, uma cepa recombinante de que expressa beta-galactosidase (lactase) de qualidade alimentar. O tratamento com a cepa induziu melhora na microbiota bacteriana e na motilidade intestinal dos camundongos desafiados com lactose, aliviando os sintomas de intolerância à lactose. Os autores concluíram este ser um modelo murino de intolerância à lactose (LI, J. et al., 2012).

Aliás, camundongos Balb/c tem altas atividades de lactase intestinal antes do desmame, mas essa atividade vai baixando significativamente após o desmame, resultando em níveis baixos após nove semanas de idade; fenômeno similar ao que ocorre com os humanos (HE; LU; HUANG, 2005).

Estudo similar sobre a intolerância à lactose foi realizado em ratos Wistar. Os ratos foram tratados com dieta rica em lactose (dieta contendo 35% de lactose por 14 dias) para induzir diarreia, recebendo ainda a shen-ling-bai-zhu-san, uma erva utilizada desde a antiguidade pela medicina tradicional chinesa (JI et al., 2019). Vários parâmetros foram avaliados: atividade geral, agrupamento dos indivíduos, peso corporal, consumo de ração e de água, descrição das fezes, função de absorção intestinal (ensaio de captação de d-xilose), análise por microscopia eletrônica de transmissão de ultraestruturas dos segmentos intestinais,

incluindo jejuno, íleo, cólon proximal e distal, além de imuno-histoquímica e *western blotting* para proteínas de transporte de sódio. Os ratos apresentaram diarreia em 24-48 horas após o consumo da dieta rica em lactose e vários outros prejuízos nos parâmetros analisados. O estudo traça um paralelo com a intolerância à lactose e conclui que a erva foi eficiente em aliviar os sintomas (JI et al., 2019).

Para entender os mecanismos de ação que acarretam a deficiência da lactase, os receptores ativados por proliferador de peroxissoma gama (PPAR γ , sigla do inglês) foram estudados, uma vez que desempenham papel chave no metabolismo de carboidratos. Para indução de sintomas associados à intolerância à lactose, ratos adultos receberam dieta rica em lactose (15-60% do peso total da dieta). Dentre outros prejuízos, os ratos apresentaram perda de peso, diarreia e aumento significativo no peso e tamanho do ceco (FUMERY et al., 2017). No mesmo estudo, achados *in vitro* e *in vivo* revelaram que a modulação dos PPAR γ melhorou a funcionalidade do sistema e os sintomas induzidos pela dieta enriquecida em lactose em ratos e camundongos. Os autores concluíram que estratégias terapêuticas para tratar a má absorção de lactose devem focar nos PPAR γ (FUMERY et al., 2017).

Basicamente, esses são os estudos focando modelos de intolerância à lactose em roedores. Como se pode notar, ainda carece muitos estudos a serem realizados para o entendimento dos mecanismos associados e desdobramentos da intolerância à lactose.

Por tudo citado até aqui, como a alta incidência da intolerância à lactose, as limitações dos conhecimentos relacionados aos seus mecanismos de ação e aos modelos experimentais, bem como a correlação com prejuízos psiquiátricos e reprodutivos, o objetivo deste projeto foi de propor e estudar modelos experimentais de intolerância à lactose em ratas adultas, estudando aspectos comportamentais e reprodutivos femininos, e buscando entender os mecanismos locais, sistêmicos e centrais envolvidos. Para tanto, foi estudado eixo HHG, incluindo mecanismos genéticos e aspectos morfológicos. Assim, este projeto pretendeu responder perguntas como se a intolerância à lactose causa prejuízos psiquiátricos e reprodutivos, quais são esses prejuízos e seus mecanismos associados.

2. OBJETIVOS

A seguir, são apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos deste trabalho.

2.1 Objetivo geral

Avaliar se a intolerância à lactose induz prejuízos psiquiátricos e reprodutivos femininos, estudando mecanismos locais, sistêmicos e centrais envolvidos.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos são:

- Definir as concentrações de lactose das dietas disponibilizadas para as ratas, sua formulação, via de administração e efeitos em aspectos gerais da saúde;
- Propor dois modelos experimentais de intolerância à lactose em ratas adultas com o fornecimento de dietas ricas em lactose;
- Avaliar em ratas adultas a manifestação de características relacionadas à intolerância à lactose (escore das cêbala fecais e monitoramento de sinais clínicos);
- Avaliar em ratas adultas se os modelos experimentais de intolerância à lactose afetam comportamentos relacionados à atividade motora e ansiedade;
- Avaliar em ratas adultas se os modelos experimentais de intolerância à lactose afetam a morfologia de órgãos reprodutivos internos (útero e ovário, histopatologia e morfometria);
- Avaliar em ratas adultas se os modelos experimentais de intolerância à lactose afetam a morfologia entérica (histopatologia e morfometria);
- Avaliar em ratas adultas se os modelos experimentais de intolerância à lactose afetam a expressão de genes-chave do eixo HHG e intestinal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção, são apresentados os procedimentos éticos e legais, informações relativas aos animais utilizados no estudo e detalhes metodológicos dos Experimentos 1 e 2. Especificamente, o **Experimento 1** propôs definir e padronizar a solução de lactose aplicada experimentalmente, levando em conta aspectos físico-químicos, o consumo e aspectos de saúde para definição da solução de lactose. A metodologia relativa ao **Experimento 2** descreve as soluções, dietas, grupos e delineamento experimental aplicados, bem como detalhes sobre o monitoramento dos sinais clínicos, teste comportamental, o estudo morfológico em órgãos reprodutivos internos e no intestino (histopatologia e morfometria), o estudo da expressão de genes-chave do eixo HHG e intestinal e as análises estatísticas realizadas.

3.1 Declaração de ética

Este projeto foi iniciado experimentalmente após sua aprovação junto a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNIP), de acordo com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório. O projeto foi aprovado pela CEUA/UNIP sob número 8426191121 (**Anexo 1**). Essas diretrizes são baseadas nas normas do *National Institutes of Health* (Bethesda, MD). Os experimentos foram realizados de acordo com os protocolos de boas práticas de laboratório com métodos de garantia de qualidade. Todos os esforços possíveis foram realizados para minimizar o sofrimento dos animais.

3.2 Animais

Foram utilizadas 32 ratas (*Rattus norvegicus*) Wistar adultas e quatro ratos machos (total de 36 ratos), com aproximadamente 90 dias de vida, fornecidos de biotério credenciado (Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil). Esses ratos foram alojados no Biotério de Experimentação da Universidade Paulista (São Paulo, SP). Os ratos permaneceram em gaiolas-moradia (45,5 x 34,5 x 20 cm, até quatro por gaiola, separados por sexo) com filtro na parte superior, em sistema de rack ventilado (Tecniplast, Buguggiate, VA, Itália), permitindo aeração e trocas de ar constante. As camas dessas gaiolas-moradia eram constituídas de

maravalha (esterilizada e livre de resíduos). O ambiente possuía temperatura ($24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (entre 55% e 65%) controladas constantemente por sistema automatizado. O ciclo de luz também era automatizado, com luz artificial (12 horas claro/12 horas escuro; luzes ligadas às 7h00). Os animais tinham livre acesso a ração irradiada (específica para a espécie, BioBase, Águas Frias, SC, Brasil) e água filtrada. Os ratos permaneceram no mínimo por um período de sete dias nessas condições em nosso biotério para aclimação antes do início dos procedimentos experimentais.

3.3 Experimento 1

O **Experimento 1** propôs definir as concentrações de lactose das dietas disponibilizadas para as ratas, sua formulação, via de administração e efeitos em aspectos gerais da saúde.

3.3.1 Padronização da solução de lactose

Para a confecção das soluções de lactose em diferentes concentrações, foi utilizada a lactose monoidratada (U.S.P. 40, Nro. CAS 10039-26-6, Labsynth Ltda, Diadema, Brasil).

Foram testadas diferentes concentrações de lactose, em ordem decrescente: 50%, 35%, 25% e 14% de lactose, sempre diluída em água filtrada fornecida para criação dos roedores. A concentração de 50% de lactose foi baseada em um estudo experimental que avaliou aspectos relacionados à fertilidade de camundongos (SWARTZ; MATTISON, 1988). A concentração de 35% de lactose foi baseada em um estudo experimental que avaliou os efeitos da exposição de ratos a uma dieta rica em lactose (35%) ao longo de 14 dias, revelando sintomas como diarreia e prejuízos comportamentais (JI et al., 2019). A concentração de 25% de lactose foi baseada em estudo experimental que revelou prejuízos em parâmetros metabólicos e fermentações colônicas em ratos (ALEXANDRE et al., 2013). Por fim, a concentração de 14% de lactose foi baseada nas informações técnicas de solubilidade máxima da lactose em água fornecida pelo fabricante da lactose (lactose monoidratada U.S.P. 40, Nro. CAS 10039-26-6, Labsynth Ltda, Diadema, Brasil). Todos os estudos citados como fonte das concentrações de lactose utilizaram vias de administração diferentes daquela proposta no presente estudo. No caso, os trabalhos da literatura utilizaram basicamente a via de

administração oral da lactose misturada/confeccionada em ração rica em lactose. Detalhes em cada uma das publicações citadas neste parágrafo.

Como mencionado anteriormente, é importante destacar que mesmo a concentração de 14% de lactose é considerada uma solução rica em lactose, comparada à concentração de lactose que existe no leite materno humano - 6,9-7,2%, (FOX; MCSWEENEY, 1998; PASTUSZKA; BARLOWSKA; LITWINCZUK, 2016) e de rato - 1,1-2,6% (FOX; MCSWEENEY, 1998). Também é importante destacar que ratos adultos são naturalmente deficientes de lactase, e, mesmo concentrações baixas de lactose devem gerar problemas de digestão (ALEXANDRE et al., 2013).

As diferentes soluções de lactose, nas diferentes concentrações, foram formuladas em diferentes protocolos, modificando variáveis como a temperatura na qual a solução foi confeccionada, a forma de aquecimento por diferentes aparatos, sua agitação, diferentes recipientes para sua confecção, descanso etc. Todos os detalhes das variáveis modificadas, volumes preparados e protocolos metodológicos para a confecção das soluções de lactose estão descritos na **Tabela 1**. As variações metodológicas sempre tiveram o intuito de obter uma solução rica em lactose que apresentasse boa palatabilidade para o consumo de ratos e que não cristalizasse ou se deteriorasse rapidamente.

Após a confecção de cada solução de lactose, estas foram avaliadas diariamente, por até 168 horas (sete dias), quanto a aspectos gerais da solução, como sua coloração, seu odor, sua viscosidade e evidências de colonização de microorganismos como fungos.

3.3.2 Consumo e aspectos de saúde para definição da solução de lactose

Quatro ratos adultos foram expostos a bebedouros com as diferentes soluções e concentrações de lactose, mantendo a oferta de ração e água *ad libitum*. Diariamente, os ratos foram monitorados quanto a aspectos gerais da saúde, suas ciber fecais, além da avaliação do consumo da solução de lactose.

Ao todo, foram realizados sete testes experimentais, descritos em detalhes na **Tabela 1**. A **Figura 3** ilustra a confecção das soluções de lactose.

A formulação da solução de lactose administrada no bebedouro e não administrada por gavagem (alimentação forçada por cânula metálica) foi baseada no fato que a gavagem estressa o roedor e causa prejuízos comportamentais (BROWN; DINGER; LEVINE, 2000), que são objetos de estudo deste modelo.

Tabela 1 – Metodologia do Experimento 1. Protocolos metodológicos dos sete testes realizados no Experimento 1 com diferentes concentrações de lactose e variações de confecção (temperatura e agitação)

Teste	Concentração de lactose	Referência da concentração	Solução (lactose/água^A)	Aquecimento/ Temperatura^B	Agitação^C	Observação
1	50%	(SWARTZ; MATTISON, 1988)	200g/400mL	ambiente	3 min	Figura 3A
2	50%	(SWARTZ; MATTISON, 1988)	200g/400mL	bico de Bunsen, 80°C	não ^D	-
3	50%	(SWARTZ; MATTISON, 1988)	100g/200mL	banho-maria, 80°C	não ^E	Figura 3B
4	35%	(JI et al., 2019)	70g/200mL	banho-maria, 93,5°C	50 min	Figura 3C
5	25%	(ALEXANDRE et al., 2013)	50g/200mL	banho-maria, 93,5°C	40 min	-
6	14%	Bula produto	28g/200mL	ambiente	3 min	-
7	14%	Bula produto	28g/200mL	banho-maria, 93,5°C	30 min	-

^A água filtrada fornecida para criação dos roedores;

^B referência usada para a escolha das temperaturas: (FOX; MCSWEENEY, 1998)

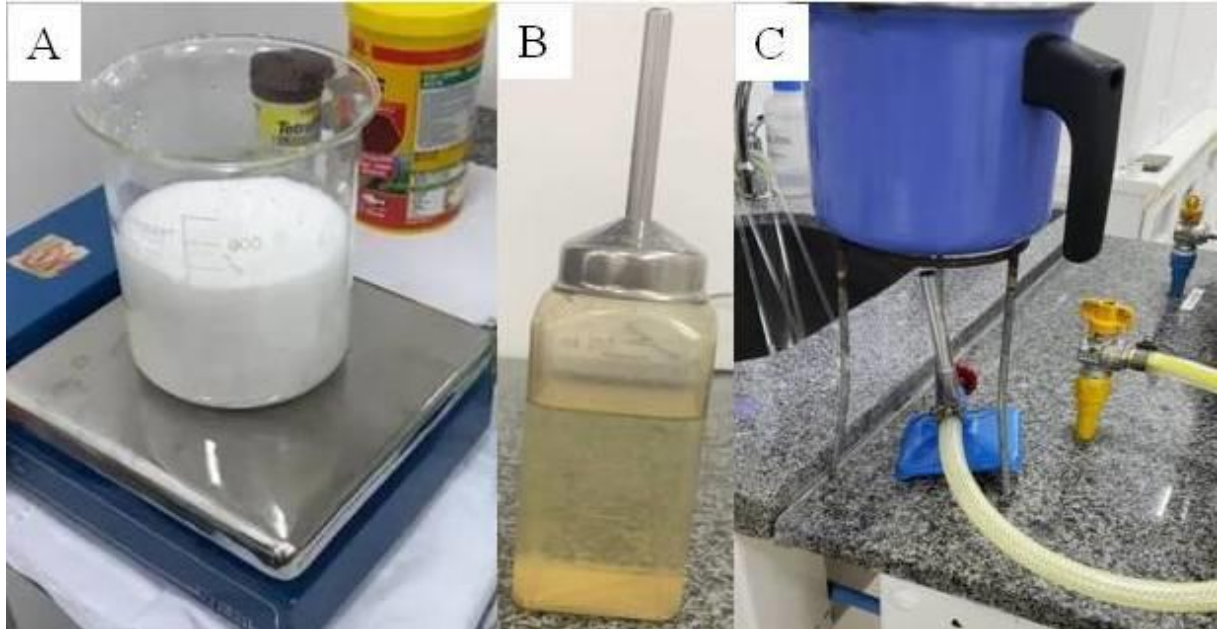
^C agitador magnético;

^D a solução foi depositada ainda quente no bebedouro plástico que os ratos iriam beber e foi resfriada neste recipiente;

^E a solução foi mantida em repouso até atingir a temperatura ambiente em um béquer de vidro e só então depositada no bebedouro plástico que os ratos iriam beber;

Fonte: dos autores

Figura 3 – Confeção das soluções no Experimento 1. Confeção das soluções de lactose no Experimento 1. (A) Processo de confecção e agitação da solução de lactose 50% realizada no Teste 1; (B) Solução de lactose 50% pronta no bebedouro (Teste 3); (C) Processo de confecção da solução de lactose 35% com aquecimento em banho-maria, realizada no Teste 4



Fonte: dos autores

3.4 Experimento 2

O **Experimento 2** propôs dois modelos experimentais de intolerância à lactose em ratas adultas com o fornecimento de dieta rica em lactose, bem como a avaliação em ratas adultas da manifestação de características relacionadas à intolerância à lactose com o escore das cíbalas fecais e monitoramento de sinais clínicos. Além disso, estudou comportamentos relacionados à atividade motora e ansiedade, a morfologia de órgãos reprodutivos internos e do intestino (histopatologia e morfometria) e a expressão de genes-chave do eixo HHG e intestinal.

3.4.1 Tratamentos, grupos e delineamento experimental

Uma vez definida a concentração de 14% para a solução de lactose (detalhes no item **Resultados**) o segundo experimento foi proposto para avaliar se a intolerância à lactose induz

prejuízos comportamentais e na reprodução feminina, estudando os mecanismos locais, sistêmicos e centrais envolvidos.

O **Experimento 2** foi realizado avaliando três grupos (n=8 ratas/grupo):

- Grupo controle: ratas adultas alimentadas com ração padrão (descrita anteriormente) e água filtrada *ad libitum*;
- Grupo lactose: ratas alimentadas por 14 dias seguidos por via oral *ad libitum* com uma solução rica em lactose além de ração padrão (descrita anteriormente) e água filtrada *ad libitum*. Esse grupo recebeu solução de 14% de lactose (monoidratada, U.S.P. 40, Nro. CAS 10039-26-6, Labsynth Ltda, Diadema, Brasil) disponível em um bebedouro na gaiola moradia, assim como o padronizado no **Experimento 1**;
- Grupo fórmula: ratas alimentadas por 14 dias seguidos por via oral *ad libitum* com uma solução de fórmula comercial de leite em pó para o uso infantil de segmento para lactantes rico em lactose: Aptamil 2 Premium (Danone, Buenos Aires, Argentina) além de ração padrão (descrita anteriormente) e água filtrada *ad libitum*. Esse grupo também recebeu a dieta em um bebedouro disponível na gaiola moradia.

Informações nutricionais fornecidas na bula da fórmula comercial do produto (Aptamil 2 Premium) detalham uma concentração de 53% de lactose nesta fórmula. A solução foi confeccionada seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante, com 210 mL de água fervida previamente e sete colheres-medida da fórmula.

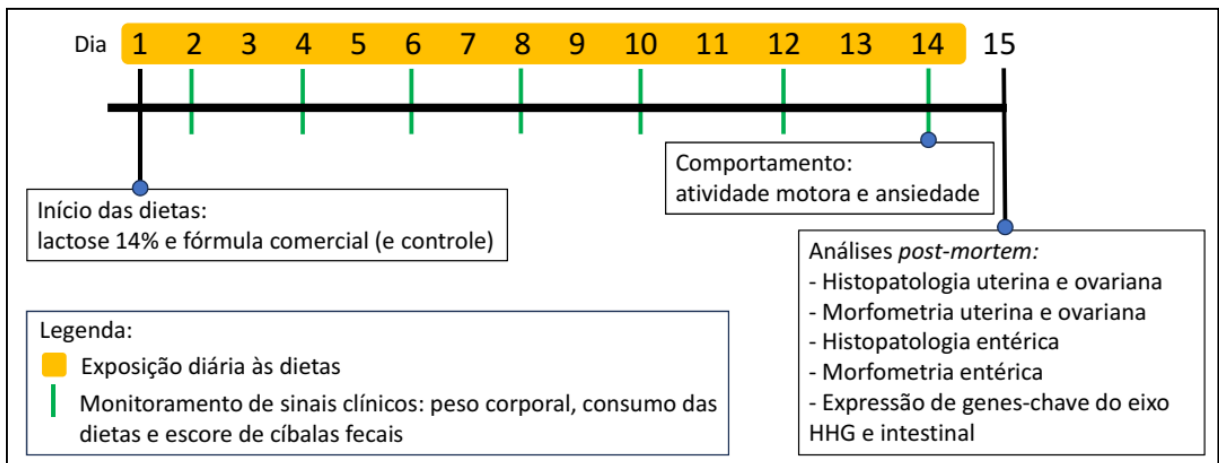
Ambas as dietas foram reservadas em temperatura ambiente ($24^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$) para resfriamento e só então acondicionadas em bebedouros especiais para roedores, idênticos aqueles usados para o consumo de água. Essas soluções eram disponibilizadas diariamente por 14 dias consecutivos para as ratas baseados no estudo de Ji e colaboradores (2019). A solução de lactose permanecia por 24 horas a disposição dos roedores, baseados nos resultados do **Experimento 1**. No caso da fórmula comercial, a solução era fornecida para as ratas somente em um intervalo de seis horas por dia, conforme informações do fabricante, de modo a minimizar a possibilidade de deterioração.

Essas ratas foram monitoradas quanto a sinais clínicos e características das cı́balas fecais a cada 48 horas a partir do primeiro dia de tratamento, até o último dia de experimento. No último dia de dieta (14^o dia), as ratas de todos os grupos foram avaliadas individualmente quanto ao seu comportamento em ambiente novo inescapável. No dia seguinte do término dos

protocolos de dietas (15º dia), as ratas foram submetidas à eutanásia e foram coletados órgãos reprodutivos internos, intestino e encéfalo para avaliações, morfológicas, histopatológicas e genéticas, conforme descrito nos próximos itens. A **Figura 4** ilustra o delineamento experimental do **Experimento 2**.

Todas as avaliações nas ratas, incluindo monitoramento clínico e coleta de tecidos foi realizada sempre no período da manhã, entre 8h00 e 11h00, para minimizar variações induzidas por alterações no ritmo circadiano dos ratos.

Figura 4 – Delineamento experimental do Experimento 2. Delineamento experimental do Experimento 2, incluindo a cronologia dos dias de exposição às dietas ricas em lactose, o monitoramento dos sinais clínicos, a avaliação comportamental e as análises *post-mortem*



Fonte: dos autores

3.4.2 Monitoramento de sinais clínicos

Todas as ratas do **Experimento 2** foram avaliadas quanto ao monitoramento de sinais clínicos a cada 48 horas a partir do primeiro dia de tratamento, até o último dia de experimento, isto é, foram avaliadas nos dias 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14. Os parâmetros avaliados foram: peso corporal (g), consumo das dietas (soluções, mL) e escore de cíbalas fecais.

A análise do consumo das dietas (lactose e fórmula) foi realizada subtraindo o valor inicial de cada dieta líquida pelo valor encontrado no bebedouro com escala em mL (a cada 48h). Cada gaiola continha sempre quatro ratas, portanto, o consumo foi considerado de forma coletiva.

A análise da consistência das ciberbalas fecais foi baseada em escores de 1 a 4, adaptado do estudo de Akhtar e colaboradores (2021). O escore 1 referiu-se a ciberbalas fecais com consistência normal (firmes e duras); o escore 2 correspondeu a ciberbalas fecais em formato alongado, levemente amolecido; o escore 3 correspondeu a ciberbalas fecais amolecidas; e o escore 4 correspondeu a ciberbalas fecais aquosas.

3.4.3 Comportamento: atividade motora e ansiedade

No último dia das diferentes dietas, isto é, após protocolo de 14 dias consecutivos de exposição à solução de lactose ou solução de fórmula comercial (e grupo controle), as ratas foram avaliadas individualmente quanto ao seu comportamento em ambiente novo inescapável com o intuito de avaliar comportamentos das ratas relacionados à atividade motora, exploratória e níveis de ansiedade (MAZUCO et al., 2019).

Foi utilizada uma arena de madeira pintada com tinta acrílica lavável (70 cm de comprimento x 70 cm de largura x 50 cm de altura). A arena era dividida em três compartimentos: um central e maior (25 cm de largura) e dois compartimentos laterais e menores (21,5 cm de largura), todos com 70 cm de comprimento e 50 cm de altura. As duas paredes paralelas que dividiam os três compartimentos possuíam uma abertura (12 cm de largura x 11 cm de altura) de modo que um sujeito experimental pôde explorar livremente os três compartimentos. O teste era iniciado ao introduzir individualmente e gentilmente os sujeitos experimentais no compartimento central da arena. Cada avaliação individual durou cinco minutos e foi realizada em sala pequena, isolada do experimentador, com isolamento acústico e luz indireta. Todas as sessões foram filmadas por equipamento alocado acima da arena.

Os parâmetros avaliados no teste comportamental foram: frequência de levantar (número total de vezes que o animal apresentou postura de permanecer apoiado nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, podendo ou não tocar com as patas anteriores as paredes do aparato), frequência de cruzamentos entre compartimentos (número de vezes que o animal se deslocou com as quatro patas para outro compartimento), tempo em segundos de permanência no compartimento central, tempo em segundos de locomoção nos compartimentos periféricos, e tempo em segundos de locomoção no compartimento central.

3.4.4 Histopatologia uterina e ovariana

O útero e o ovário das ratas de todos os grupos estudados foram coletados no dia seguinte do término dos protocolos de dietas, isto é, no 15º dia de experimento, imediatamente após procedimento de eutanásia. O método de eutanásia foi por decapitação pelo fato de que avaliações de parâmetros hormonais e moleculares epigenéticos (explicados nos próximos itens) serem influenciadas por anestésicos e analgésicos, de acordo com a literatura (ZURAWEK et al., 2019; LAUBY; MCGOWAN, 2020; SINGH et al., 2020).

O útero e o ovário direito foram rapidamente coletados e acondicionados individualmente em tubos contendo solução de formol a 10% em tampão fosfato de Sorensen (pH neutro). Para avaliação histopatológica, procedimentos histológicos padrão foram realizados (XAVIER et al., 2007). Resumidamente, os órgãos foram desidratados em etanol, submetidos a xileno e incorporados em parafina. Os blocos foram cortados em secções de cinco micrometros em micrótomo e corados com hematoxilina e eosina (HE) para análises histopatológicas. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Opticam Microscopy Technology, O400S).

Cada rata de cada grupo foi avaliada quanto a sua fase lútea (AKINJIOLA et al., 2018; CASTAÑEDA, 2018). Somente as ratas em metaestro e diestro foram selecionadas para as avaliações histopatológicas. As ratas em fase folicular (fase não lútea) foram descartadas dessa análise.

Foram considerados metodologias e parâmetros preconizados (CAMARGO et al., 2016). Assim, foi realizada a avaliação histopatológica uterina e ovariana.

3.4.5 Morfometria uterina e ovariana

O mesmo material histológico utilizado para a avaliação histopatológica uterina e ovariana foi empregado para a análise morfométrica uterina e ovariana, inclusive no que diz respeito a seleção de ratas em fase lútea (metaestro e diestro).

A morfometria do endométrio e do miométrio uterino foi realizada de acordo com a literatura (COSTA; MORAIS, 2022), com ajuda do software Image J (*National Institutes of Health*). Resumidamente, utilizando microscópio óptico (Nikon Eclipse E 200 MV R, Tokyo, Japan) com aumento de 40 e 100 vezes, foram obtidas cinco fotomicrografias do útero de

cada rata de cada um dos três grupos. Em cada fotomicrografia foram obtidas as espessuras dos miométrios e endométrios.

Para a análise estatística, as cinco medidas de cada útero (do endométrio e do miométrio) de cada rata foram utilizadas para o cálculo da média por animal, utilizada como unidade. Os valores das espessuras são expressos em micrômetros (μm).

As mesmas ratas cujos úteros foram coletados e avaliados também foram utilizadas para a análise morfométrica ovariana. Em específico, o diâmetro (μm) dos corpos lúteos e o número de corpos lúteos por área foram quantificados (SILVA et al., 2004; COSTA; MORAIS, 2022). Das fotomicrografias do ovário obtidas em aumento de 40 e 100 vezes foram mensuradas dez secções do diâmetro dos corpos lúteos de cada rata e realizada a contagem dos corpos lúteos (SILVA et al., 2004; COSTA; MORAIS, 2022). Para a análise estatística, as dez medidas de cada ovário de cada rata foram utilizadas para o cálculo da média por animal, utilizada como unidade.

3.4.6 Histopatologia entérica

O intestino delgado das mesmas ratas utilizadas para a coleta de útero e ovário foi coletado para análises morfológicas. Primeiramente, após a obtenção de um fragmento de aproximadamente 15 milímetros de intestino delgado, seu lúmen foi lavado com soro fisiológico e então o fragmento foi individualmente acondicionado em tubo contendo solução de formol a 10% em tampão fosfato de Sorensen (pH neutro). A partir daí, os mesmos procedimentos histológicos descritos para as amostras de útero e ovário foram realizados no intestino delgado a fim de se obter lâminas coradas com HE para observação em microscopia óptica.

3.4.7 Morfometria entérica

O mesmo material histológico entérico utilizado para a análise histopatológica foi empregado para análise morfométrica, com ajuda do software Image J (*National Institutes of Health*). Nas análises morfométricas do intestino delgado foram aferidas a altura das vilosidades intestinais e a profundidade das criptas de Lieberkühn, segundo descrito pela literatura (TAAVELA et al., 2021). Para tanto, para cada um dos dois parâmetros (vilosidades e criptas)

foram tomadas dez medidas diferentes para cada rata, de modo a obter uma média por animal (CARVALHO et al., 2015). A medida de altura da vilosidade foi tomada a partir da região basal da mucosa intestinal, coincidente com a porção superior das criptas, até seu ápice. As criptas foram medidas da sua base até a região de transição cripta-vilosidade (TAAVELA et al., 2021).

De posse dos valores de altura das vilosidades e profundidade das criptas, foi calculado o índice vilosidade-cripta (SEYYEDIN; NAZEM, 2017). No caso, o índice vilosidade-cripta (IVC) foi obtido a partir da divisão dos valores das alturas das vilosidades pela profundidade das criptas adjacentes.

Ainda a respeito da análise morfológica entérica, foram quantificados três tipos de células na membrana basal das vilosidades: células epiteliais intestinais (enterócitos), leucócitos intraepiteliais mononucleares (linfócitos) e células caliciformes (PEREIRA et al., 2018). A contagem de cada tipo celular (enterócitos, linfócitos e células caliciformes) foi realizada por vilosidade, em um total de dez vilosidades por amostra. Posteriormente foi calculada a somatória para obtenção dos valores de contagem total.

3.4.8 Expressão de genes-chave do eixo HHG e intestinal

As mesmas ratas que tiveram seus intestinos delgados e órgãos reprodutivos coletados para análises morfológicas também tiveram parte desses órgãos além de seus encéfalos coletados para avaliações moleculares. Os encéfalos foram imediatamente e rapidamente (em até três minutos) dissecados de modo a coletar o hipotálamo de cada rata. Esses hipotálamos foram individualmente acondicionados em tubos cônicos identificados e imediatamente estocados em ultrafreezer -80°C. Para a amostra de ovário, somente o ovário do lado esquerdo foi selecionado para a análise genética. No caso, cada ovário esquerdo foi individualmente acondicionado em um tubo cônico identificado e imediatamente estocado em ultrafreezer -80°C. Para as amostras de intestino delgado, um fragmento de aproximadamente 15 milímetros, foi reservado para a análise genética. Neste caso, primeiramente o lúmen foi lavado com soro fisiológico e então o fragmento foi individualmente acondicionado em tubos cônicos identificados e imediatamente estocados em ultrafreezer -80 °C.

O hipotálamo, parte do eixo HHG, foi utilizado para a avaliação da expressão dos genes do GnRH (*Gnrh1*, *gonadotropin releasing hormone 1*), do receptor da progesterona

(*Pgr*, progesterone receptor), da kisspeptina (*Kiss1*, *KiSS-1 metastasis-suppressor*) e do receptor da kisspeptina (*Kiss1r*, *KISS1 receptor*, também conhecido como Gpr54). O ovário, também parte do eixo HHG, foi utilizado para a avaliação da expressão dos genes do receptor do LH (*Lhcgr*, *luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor*), do receptor do FSH (*Fshr*, *follicle stimulating hormone receptor*) e do fator de ligação imunomodulador de progesterona 1 (*Pibfl*, *progesterone immunomodulatory binding factor 1*). O intestino delgado foi utilizado para a avaliação da expressão do gene da enzima triptofano hidroxilase 1 (*Tph1*, *tryptophan hydroxylase 1*).

A metodologia relacionada a avaliação da expressão gênica foi semelhante aquela previamente descrita em nossos laboratórios (MEDEIROS et al., 2023). Resumidamente, foi realizada a extração do ácido ribonucleico (RNA) total das amostras pelo método TRIzol/Clorofórmio/Isopropanol. Após homogeneização das amostras de tecido em 250 μ L do reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), a separação da fase aquosa foi realizada pela adição de 0,2 mL de clorofórmio (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA), seguido pela centrifugação (14.000 rpm) por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa (sobrenadante) foi então coletada em tubos novos e a precipitação do RNA total foi realizada pela adição de 0,5 mL de isopropanol absoluto gelado (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA). As amostras foram então incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e o RNA precipitado por centrifugação a 14.000 rpm por 15 min a 4°C. O isopropanol foi descartado por inversão e o RNA precipitado (*pellet*) foi lavado com etanol 75%. A quantidade e pureza do RNA extraído foi estimadas em aparelho de espectrofotometria após sua ressuspensão em 20 μ L de água DEPC utilizando as razões de densidade óptica (OD) 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience). As amostras foram armazenadas a -80°C.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir da transcrição reversa de 2000 ng de RNA total na presença de 2 U da enzima transcriptase reversa (Kit Superscript II, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. A primeira fita de cDNA foi gerada em uma reação com volume final de 20 μ L contendo 500 μ M de dNTP, 25 μ g/mL de OLIGO dT, 1X solução tampão de primeira fita, 40 U de inibidor de RNase e 10 μ M de DTT pela enzima Superscript II. Inicialmente, a mistura de RNA, água e iniciador foi incubada a 65°C por 5 minutos para promover a abertura de possíveis estruturas secundárias. Em seguida, a reação de síntese de cDNA aconteceu por 50 minutos a 50°C, seguido por inativação enzimática por 5 minutos a 85°C. Após o término, o cDNA sintetizado foi diluído para concentração final de 100 ng/ μ L e armazenado a -20°C.

Tabela 2 – Iniciadores específicos para a expressão gênica. Sequências de iniciadores específicos para o estudo da expressão gênica e condições de ciclagem da reação em cadeia da polimerase quantitativo em Tempo Real (q-PCR)

Gene (ID)	Iniciador	Condições da reação	Tamanho do fragmento
<i>Gnrh1</i> (25194)	<i>Forward</i> AGC ACT GGT CCT ATG GGT TG <i>Reverse</i> GTC ACA CTC GGA TGT TGT GG	95°C–15s; 64°C–30s; 72°C–30s	248 pb
<i>Pgr</i> (25154)	<i>Forward</i> GGT GGA GGT CGT ACA AGC AT <i>Reverse</i> AGG CCT TCC AAA GGA ATT GT	95°C–15s; 65°C–30s; 72°C–30s	214 pb
<i>Kiss1</i> (289023)	<i>Forward</i> AGC TGC TGC TTC TCC TCT GT <i>Reverse</i> AGG CTT GCT CTC TGC ATA CC	95°C–15s; 59°C–30s; 72°C–30s	152 pb
<i>Kiss1r</i> (78976)	<i>Forward</i> GGT GCT GGG AGA CTT CAT GT <i>Reverse</i> AGT GGC ACA TGT GGC TTG	95°C–15s; 59°C–30s; 72°C–30s	73 pb
<i>Lhcgr</i> (25477)	<i>Forward</i> TCA ATT CTT GTG CCA ATC CA <i>Reverse</i> TAA CGC TCT CTG GGG TAT GG	95°C–15s; 60°C–30s; 72°C–30s	242 pb
<i>Fshr</i> (25449)	<i>Forward</i> CTC ATC AAG CGA CAC CAA GA <i>Reverse</i> GGA AAG GAT TGG CAC AAG AA	95°C–15s; 55°C–30s; 72°C–30s	185 pb
<i>Pibfl</i> (306104)	<i>Forward</i> CTG GAC CAT CAA AAG GAG GA <i>Reverse</i> CTC CAA ATC CAG TGC CAT CT	95°C–15s; 60°C–30s; 72°C–30s	237 pb
<i>Tph1</i> (24848)	<i>Forward</i> AAT TTG CCA AAA CCG TGA AG <i>Reverse</i> AAG GCT TTC TGC ACT GGA AA	95°C–15s; 64,5°C– 30s; 72°C–30s	141 pb
<i>Rnu6</i> (19862)	<i>Forward</i> CTC GCT TCG GC AGC ACA <i>Reverse</i> AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT	95°C–15s; 58°C–30s; 72°C–30s	94 pb

(ID) número de identificação do gene, (pb) pares de base

Fonte: dos autores

A quantificação da expressão gênica foi realizada por reação em cadeia da polimerase quantitativo em Tempo Real (q-PCR). O q-PCR foi realizado com o SYBR Green (Applied Biosystems, USA) no aparelho StepOnePlus (Applied Biosystems, USA). Para estudar o padrão de expressão gênica dos genes supracitados as reações foram realizadas com iniciadores específicos (**Tabela 2**) e tiveram como controle endógeno o gene *Rnu6* (*U6 small nuclear RNA*). Todas as reações tiveram volume final de 10 µL: 1 µL do cDNA sintetizado, 5 µL de SYBR Green I Master (LightCycler 480, Roche Applied Science), 0,4 µM dos iniciadores específicos (*primers*) e q.s.p. de água *Milli-Q Rnase free*. A **Tabela 2** também demonstra as condições das reações e as temperaturas de anelamento. A quantidade relativa

dos transcritos foi determinada pelo método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta Ct}$. Neste método, a média do Ct do gene alvo foi subtraída pela média do Ct do gene controle, resultando em um ΔCt . Para o cálculo da expressão foi substituído o valor de ΔCt obtido na fórmula $2^{-\Delta Ct}$. Os valores finais foram apresentados como razão entre a expressão do gene alvo em relação à expressão gênica do gene utilizado como normalizador. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão de cada animal independente realizado em duplicata técnica e normalizado em relação ao grupo controle (atribuído valor 1).

3.5 Análises estatísticas

Foram verificadas a homocedasticidade e a normalidade dos dados com os testes de Bartlett, Shapiro-Wilk (W) e Kolmogorov-Smirnov (KS). Foram utilizadas as análises de variância (ANOVA) de duas vias (fatores: dieta e dias de exposição) e uma via, seguidas pelos pós-testes de comparações múltiplas de Sidak ou Tukey para comparar dados paramétricos entre os grupos. Para os dados não-paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Dunn. Esses procedimentos foram testados para possíveis *outliers* pelo método de ROUT. O nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi considerado suficiente para mostrar diferenças significativas em todos os dados analisados. Os dados são expressos como média e respectivos erros-padrão e como *box & whiskers*, mostrando todos os valores.

4. RESULTADOS

Nesta seção, são apresentados os resultados relativos aos estudos realizados para os Experimentos 1 e 2. No **Experimento 1** são apresentados os resultados dos sete testes realizados para a definição da concentração da solução de lactose empregada nos experimentos seguintes, levando em consideração aspectos como descrições físico-químicas das soluções e a saúde dos ratos. No **Experimento 2** são apresentados os resultados do monitoramento de sinais clínicos, do comportamento (atividade motora e ansiedade), da histopatologia uterina e ovariana, da morfometria uterina e ovariana, da histopatologia entérica, da morfometria entérica e da expressão de genes-chave do eixo HHG e intestinal.

Os resultados revelaram que as concentrações superiores a 14% (50, 35 e 25%) de lactose cristalizaram e prejudicaram o consumo. A solução de 14% não apresentou alterações físico-químicas e resultou em boa palatabilidade. Essa solução de lactose e a fórmula comercial prejudicaram a consistência das cı́balas fecais a partir do dia 4. O comportamento foi afetado: efeito ansiogênico. Foi verificada hipertrofia epitelial uterina e aumento na espessura do miométrio. O estudo entérico revelou infiltração linfoplasmocı́tica, linfangiectasia, fusão de vilosidades, arrasamento criptal, diminuição do número de enterócitos, aumento do número de linfócitos e diminuição da expressão gênica de triptofano hidroxilase (Tph)1. As expressões de GnRh, kisspeptina, receptores de progesterona, LH e FSH e do fator de ligação imunomodulador de progesterona 1 aumentaram.

Este volume de Tese de Doutorado apresenta somente o resumo dos principais resultados obtidos com este estudo. Para maiores detalhes, consultar a publicação em artigo científico, ou contatar o orientador deste estudo via e-mail: Prof. Dr. Thiago B. Kirsten, thiago.kirsten@docente.unip.br ou thik@outlook.com

5. DISCUSSÃO

Este volume de Tese de Doutorado apresenta somente as conclusões do trabalho, sem sua discussão. Para maiores detalhes, consultar a publicação em artigo científico, ou contatar o orientador deste estudo via e-mail: Prof. Dr. Thiago B. Kirsten, thiago.kirsten@docente.unip.br ou thik@outlook.com

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No **Experimento 1**, as soluções produzidas contendo 50, 35 e 25 % de lactose em diferentes protocolos de confecção sedimentaram, cristalizaram e obstruíram o bucal do bebedouro, de modo a prejudicar o consumo dos ratos. Já a solução contendo 14% de lactose não apresentou alterações físico-químicas ao longo dos dias de avaliação. Além disso, a solução de 14% de lactose foi bem consumida pelos ratos, denotando boa palatabilidade, bem como seu consumo resultou em cíbalas fecais com aspecto esbranquiçado. Assim, a solução de 14% de lactose e seu protocolo de confecção foram selecionados para o **Experimento 2**.

No **Experimento 2** foram administradas duas dietas ricas em lactose por 14 dias seguidos por via oral *ad libitum*: solução contendo 14% de lactose e fórmula comercial de leite em pó para o uso infantil de segmento para lactantes. O monitoramento dos sinais clínicos revelou que ambas as dietas foram bem aceitas e consumidas pelas ratas, com predileção pela solução de lactose. Ainda assim, os pesos corporais das ratas não foram modificados pelas dietas. Ambas as dietas prejudicaram a consistência das cíbalas fecais, com efeito mais rápido (a partir do quarto dia) e mais forte (pico no décimo segundo dia) pela solução de lactose.

O estudo comportamental no último dia de exposição das dietas ricas em lactose não revelou efeitos na atividade motora, porém, revelou que a fórmula comercial induziu comportamento tipo-ansioso nas ratas, isto é, efeito ansiogênico.

Como aspectos da reprodutivos femininos eram objetos de estudo deste trabalho, os úteros e ovários das ratas expostas a dietas ricas em lactose foram estudados quanto a aspectos histopatológicos e morfométricos no dia seguinte ao término do protocolo das dietas. A dieta com fórmula comercial induziu infiltração leucocitária mista com predomínio de linfoplasmocítico, hipertrofia epitelial e debris celulares. O miométrio dessas ratas apresentou espessura aumentada.

No intuito de descobrir mecanismos patofisiológicos e neurobiológicos que explicassem os achados clínicos, comportamentais e reprodutivos das ratas expostas a dietas ricas em lactose, foram realizados estudos morfológicos e moleculares em tecidos reprodutivos, entéricos e centrais.

As avaliações histopatológicas e morfométricas dos tecidos entéricos revelaram que ambas as dietas induziram infiltração leucocitária, fusão de vilosidades e distensão de vasos linfáticos. Também foi observado que a profundidade das criptas das ratas expostas a fórmula comercial rica em lactose foi reduzida. O número de enterócitos foi reduzido e o número de

linfócitos foi elevado. Os ensaios moleculares intestinais revelaram que ambas as dietas ricas em lactose diminuíram drasticamente a expressão gênica da enzima triptofano hidroxilase 1.

O eixo HHG demonstrou-se modulado como um todo em detrimento da exposição as dietas ricas em lactose, com efeito mais marcante para a fórmula comercial: aumento nas expressões de GnRh, do receptor da progesterona, de kisspeptina, do receptor do LH, do receptor do FSH e do Pibf1. A solução de lactose aumentou a expressão do receptor da progesterona.

Concluindo, ambos os modelos experimentais desenvolvidos neste trabalho com a exposição a dietas ricas em lactose revelaram-se eficientes como modelos de intolerância à lactose. Tanto a solução de 14% de lactose como a fórmula comercial foram bem consumidas pelas ratas e fizeram com que suas cibalas fecais ficassem amolecidas. A hipótese que a intolerância à lactose está associada a maior prevalência de distúrbios psiquiátricos foi corroborada pelos achados de indução de ansiedade e explicada pela diminuição da expressão gênica da enzima triptofano hidroxilase no intestino com conseqüente prejuízo em vilosidades e criptas intestinais. A hipótese que a intolerância à lactose está associada a prejuízos reprodutivos foi corroborada por achados morfológicos uterinos marcantes. Por fim, o eixo HHG demonstrou-se chave na interface da intolerância à lactose com aspectos reprodutivos, com modulação de genes de proteínas, hormônios e de seus receptores. O modelo experimental da fórmula comercial apresentou resultados mais marcantes.

O presente trabalho abre novas perspectivas no diagnóstico e no tratamento de pacientes com intolerância à lactose, inclusive no que diz respeito a comorbidades psiquiátricas e reprodutivas.

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO-RODRIGUEZ, A.; KAUFFMAN, A. S.; CHERRINGTON, B. D.; BORGES, C. S.; ROEPKE, T. A.; LACONI, M. Emerging insights into hypothalamic-pituitary-gonadal axis regulation and interaction with stress signalling. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 30, n. 10, p. e12590, 2018.
- AKHTAR, K.; HIRSCHSTEIN, Z.; STEFANELLI, A.; IANNILLI, E.; SRINIVASAN, A.; BARENBOIM, L.; BALKAYA, M.; CUNHA, A.; AUDIL, A.; KOCHMAN, E. M.; CHUA, F.; RAVI, M.; MIKKILINENI, S.; WATKINS, H.; O'CONNOR, W., JR.; FAN, Y.; COTERO, V.; ASHE, J.; PULEO, C.; KAO, T. J.; SHIN, D. S. Non-invasive peripheral focused ultrasound neuromodulation of the celiac plexus ameliorates symptoms in a rat model of inflammatory bowel disease. **Experimental Physiology**, v. 106, n. 4, p. 1038-1060, 2021.
- AKINJIOLA, A. M.; AJALA, O. O.; AINA, O. O.; OYEBANJI, V. O.; OLUKUNLE, J. O. Histomorphometry and Protein Expression From the Ovary and Uterine Horns of Wistar Strain Albino Rats Treated with Methanol Leave Extract of Parquetina Nigrescens. **Drug Res (Stuttg)**, v. 68, n. 12, p. 717-724, 2018.
- ALEXANDRE, V.; EVEN, P. C.; LARUE-ACHAGIOTIS, C.; BLOUIN, J. M.; BLACHIER, F.; BENAMOUZIG, R.; TOME, D.; DAVILA, A. M. Lactose malabsorption and colonic fermentations alter host metabolism in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 4, p. 625-631, 2013.
- ALONSO-SOLIS, R.; ABREU, P.; LOPEZ-COVIELLA, I.; HERNANDEZ, G.; FAJARDO, N.; HERNANDEZ-DIAZ, F.; DIAZ-CRUZ, A.; HERNANDEZ, A. Gonadal steroid modulation of neuroendocrine transduction: a transynaptic view. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 16, n. 3, p. 357-382, 1996.
- ALVES DA CUNHA, D.; VALIM, T. C.; FILGUEIRAS, P. R.; LACERDA JUNIOR, V.; NETO, A. C. Lactose quantification in bovine milk by nuclear magnetic resonance without deuterated solvent (No-D qNMR). **Anal Methods**, v. 12, n. 40, p. 4892-4898, 2020.
- AZCARATE-PERIL, M. A.; RITTER, A. J.; SAVAIANO, D.; MONTEAGUDO-MERA, A.; ANDERSON, C.; MAGNESS, S. T.; KLAENHAMMER, T. R. Impact of short-chain galactooligosaccharides on the gut microbiome of lactose-intolerant individuals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 3, p. E367-E375, 2017.
- BAADKAR, S. V.; MUKHERJEE, M. S.; LELE, S. S. Study on influence of age, gender and genetic variants on lactose intolerance and its impact on milk intake in adult Asian Indians. **Annals of Human Biology**, v. 41, n. 6, p. 548-553, 2014.
- BONOMAULLY, M.; KHONG, T.; FOTRIADOU, M.; TULLY, J. Anxiety and depression related to elevated dopamine in a patient with multiple mediastinal paragangliomas. **Gen Hosp Psychiatry**, v. 36, n. 4, p. 449 e447-448, 2014.
- BROWN, A. P.; DINGER, N.; LEVINE, B. S. Stress produced by gavage administration in the rat. **Contemporary Topics in Laboratory Animal Science**, v. 39, n. 1, p. 17-21, 2000.

CAMARGO, I. C. C.; NERES, W. E.; MELLO, A. P. Q.; SIMÃO, V. A. Assessment of estrous cycle, ovarian and uterine tissue and fetal parameters of Wistar rats treated with Topiramate. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 37, n. 2, p. 55-70, 2016.

CARBALLO, I.; ALVELA, L.; PEREZ, L. F.; GUDE, F.; VIDAL, C.; ALONSO, M.; SOPENA, B.; GONZALEZ-QUINTELA, A. Serum Concentrations of IgG4 in the Spanish Adult Population: Relationship with Age, Gender, and Atopy. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0149330, 2016.

CARVALHO, G. B.; LOPES, J. B.; SILVA, S. R. G.; DOURADO, L. R. B.; MIRANDA, D. F. H.; COSTA, F. A. L. Performance, duodenal morphology and histopathology of broiler liver fed diets containing different levels of organic selenium in heat stress conditions. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 16, n. 2, p. 365-376, 2015.

CASTAÑEDA, J. G. **Efecto de ladiosgenina y la 26OH-diosgenina sobre el desarrollo celular en los ovarios y útero de la rata Wistar.** (Maestría). Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, 2018. 39 p.

CHEN, H.; MALENTACCHI, F.; FAMBRINI, M.; HARRATH, A. H.; HUANG, H.; PETRAGLIA, F. Epigenetics of Estrogen and Progesterone Receptors in Endometriosis. **Reprod Sci**, v. 27, n. 11, p. 1967-1974, 2020.

CHEN, Y. T.; MATTISON, D. R.; FEIGENBAUM, L.; FUKUI, H.; SCHULMAN, J. D. Reduction in oocyte number following prenatal exposure to a diet high in galactose. **Science**, v. 214, n. 4525, p. 1145-1147, 1981.

CHRISTENSEN, A.; BENTLEY, G. E.; CABRERA, R.; ORTEGA, H. H.; PERFITO, N.; WU, T. J.; MICEVYCH, P. Hormonal regulation of female reproduction. **Hormone and Metabolic Research**, v. 44, n. 8, p. 587-591, 2012.

COOK, G. C.; AL-TORKI, M. T. High intestinal lactase concentrations in adult Arabs in Saudi Arabia. **Br Med J**, v. 3, n. 5976, p. 135-136, 1975.

COSTA, E. F. E.; MORAIS, D. B. Morphology of the Ovaries, Uterine Tubes and Uterus of *Pteronotus gymnotus* (Chiroptera: Mormoopidae). **BioRxiv**, v., n., p. 2022.2012.2026.521015, 2022.

CRAMER, D. W.; XU, H.; SAHI, T. Adult hypolactasia, milk consumption, and age-specific fertility. **American Journal of Epidemiology**, v. 139, n. 3, p. 282-289, 1994.

DENG, Y.; MISSELWITZ, B.; DAI, N.; FOX, M. Lactose Intolerance in Adults: Biological Mechanism and Dietary Management. **Nutrients**, v. 7, n. 9, p. 8020-8035, 2015.

DI STEFANO, M.; VENETO, G.; MALSERVISI, S.; STROCCHI, A.; CORAZZA, G. R. Lactose malabsorption and intolerance in the elderly. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 36, n. 12, p. 1274-1278, 2001.

ELLENBOGEN, M. A.; YOUNG, S. N.; DEAN, P.; PALMOUR, R. M.; BENKELFAT, C. Mood response to acute tryptophan depletion in healthy volunteers: sex differences and

temporal stability. **Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 5, p. 465-474, 1996.

EVERSHED, R. P.; PAYNE, S.; SHERRATT, A. G.; COPLEY, M. S.; COOLIDGE, J.; UREM-KOTSU, D.; KOTSAKIS, K.; OZDOGAN, M.; OZDOGAN, A. E.; NIEUWENHUYSE, O.; AKKERMANS, P. M.; BAILEY, D.; ANDEESCU, R. R.; CAMPBELL, S.; FARID, S.; HODDER, I.; YALMAN, N.; OZBASARAN, M.; BICAKCI, E.; GARFINKEL, Y.; LEVY, T.; BURTON, M. M. Earliest date for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding. **Nature**, v. 455, n. 7212, p. 528-531, 2008.

FOND, G.; LOUNDOU, A.; HAMDANI, N.; BOUKOUACI, W.; DARGEL, A.; OLIVEIRA, J.; ROGER, M.; TAMOUZA, R.; LEBOYER, M.; BOYER, L. Anxiety and depression comorbidities in irritable bowel syndrome (IBS): a systematic review and meta-analysis. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, v. 264, n. 8, p. 651-660, 2014.

FORD, A. C. Generalized anxiety disorder and irritable bowel syndrome. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 30, n. 10, p. 1087-1088; author reply 1088-1089, 2009.

FOROUTAN, A.; GUO, A. C.; VAZQUEZ-FRESNO, R.; LIPFERT, M.; ZHANG, L.; ZHENG, J.; BADRAN, H.; BUDINSKI, Z.; MANDAL, R.; AMETAJ, B. N.; WISHART, D. S. Chemical Composition of Commercial Cow's Milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 17, p. 4897-4914, 2019.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Londres: Blackie Academic & Professional, 1998. 478 p.

FUMERY, M.; SPECA, S.; LANGLOIS, A.; DAVILA, A. M.; DUBUQUOY, C.; GRAUSO, M.; MARTIN MENA, A.; FIGEAC, M.; METZGER, D.; ROUSSEAU, C.; COLOMBEL, J. F.; DUBUQUOY, L.; DESREUMAUX, P.; BERTIN, B. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) regulates lactase expression and activity in the gut. **EMBO Mol Med**, v. 9, n. 11, p. 1471-1481, 2017.

GALVAO, M. C. **Estudo de modelos experimentais de intolerância à lactose em ratos: relação com distúrbios psiquiátricos**. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista, São Paulo, 2023. 63 p.

GERBAULT, P.; LIEBERT, A.; ITAN, Y.; POWELL, A.; CURRAT, M.; BURGER, J.; SWALLOW, D. M.; THOMAS, M. G. Evolution of lactase persistence: an example of human niche construction. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences**, v. 366, n. 1566, p. 863-877, 2011.

GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol**, v. 80, n. 2, p. 84-97, 2007.

GWEE, K. A.; GRAHAM, J. C.; MCKENDRICK, M. W.; COLLINS, S. M.; MARSHALL, J. S.; WALTERS, S. J.; READ, N. W. Psychometric scores and persistence of irritable bowel after infectious diarrhoea. **Lancet**, v. 347, n. 8995, p. 150-153, 1996.

HE, W.; LU, B.; HUANG, C. [Lactase and its gene regulation in BALB/c mice at different

ages]. **Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 36, n. 4, p. 516-518, 2005.

HEINE, R. G.; ALREFAEE, F.; BACHINA, P.; DE LEON, J. C.; GENG, L.; GONG, S.; MADRAZO, J. A.; NGAMPHAIBOON, J.; ONG, C.; ROGACION, J. M. Lactose intolerance and gastrointestinal cow's milk allergy in infants and children - common misconceptions revisited. **World Allergy Organ J**, v. 10, n. 1, p. 41, 2017.

ILAHY, I.; HAQ, T. U. MINI REVIEW: Role of Kisspeptin-GPR54 system in regulation of reproductive functions in human and other mammals. **Pak J Pharm Sci**, v. 34, n. 1, p. 177-184, 2021.

JI, H. J.; KANG, N.; CHEN, T.; LV, L.; MA, X. X.; WANG, F. Y.; TANG, X. D. Shen-ling-bai-zhu-san, a spleen-tonifying Chinese herbal formula, alleviates lactose-induced chronic diarrhea in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 231, n., p. 355-362, 2019.

JIN, M.; YU, Y.; HUANG, H. An update on primary ovarian insufficiency. **Sci China Life Sci**, v. 55, n. 8, p. 677-686, 2012.

KOHLI, R. M.; ZHANG, Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. **Nature**, v. 502, n. 7472, p. 472-479, 2013.

KRUTTLI, A.; BOUWMAN, A.; AKGUL, G.; DELLA CASA, P.; RUHLI, F.; WARINNER, C. Ancient DNA analysis reveals high frequency of European lactase persistence allele (T-13910) in medieval central europe. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e86251, 2014.

KURIAN, J. R.; KEEN, K. L.; TERASAWA, E. Epigenetic changes coincide with in vitro primate GnRH neuronal maturation. **Endocrinology**, v. 151, n. 11, p. 5359-5368, 2010.

KURIAN, J. R.; LOUIS, S.; KEEN, K. L.; WOLFE, A.; TERASAWA, E.; LEVINE, J. E. The Methylcytosine Dioxygenase Ten-Eleven Translocase-2 (tet2) Enables Elevated GnRH Gene Expression and Maintenance of Male Reproductive Function. **Endocrinology**, v. 157, n. 9, p. 3588-3603, 2016.

LAPIDES, R. A.; SAVAIANO, D. A. Gender, Age, Race and Lactose Intolerance: Is There Evidence to Support a Differential Symptom Response? A Scoping Review. **Nutrients**, v. 10, n. 12, p., 2018.

LAUBY, S. C.; MCGOWAN, P. O. Early life variations in temperature exposure affect the epigenetic regulation of the paraventricular nucleus in female rat pups. **Proc Biol Sci**, v. 287, n. 1937, p. 20201991, 2020.

LEDOCHOWSKI, M.; SPERNER-UNTERWEGER, B.; FUCHS, D. Lactose malabsorption is associated with early signs of mental depression in females: a preliminary report. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 43, n. 11, p. 2513-2517, 1998.

LEE, S.; WU, J.; MA, Y. L.; TSANG, A.; GUO, W. J.; SUNG, J. Irritable bowel syndrome is strongly associated with generalized anxiety disorder: a community study. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 30, n. 6, p. 643-651, 2009.

LERCHBAUM, E.; GIULIANI, A.; GRUBER, H. J.; PIEBER, T. R.; OBERMAYER-

PIETSCH, B. Adult-type hypolactasia and calcium intake in polycystic ovary syndrome. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 77, n. 6, p. 834-843, 2012.

LI, J.; ZHANG, W.; WANG, C.; YU, Q.; DAI, R.; PEI, X. Lactococcus lactis expressing food-grade beta-galactosidase alleviates lactose intolerance symptoms in post-weaning Balb/c mice. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 6, p. 1499-1506, 2012.

LI, Z.; CHALAZONITIS, A.; HUANG, Y. Y.; MANN, J. J.; MARGOLIS, K. G.; YANG, Q. M.; KIM, D. O.; COTE, F.; MALLET, J.; GERSHON, M. D. Essential roles of enteric neuronal serotonin in gastrointestinal motility and the development/survival of enteric dopaminergic neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 24, p. 8998-9009, 2011.

LOMNICZI, A.; LOCHE, A.; CASTELLANO, J. M.; RONNEKLEIV, O. K.; BOSCH, M.; KAIDAR, G.; KNOLL, J. G.; WRIGHT, H.; PFEIFER, G. P.; OJEDA, S. R. Epigenetic control of female puberty. **Nature Neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 281-289, 2013.

LOMNICZI, A.; WRIGHT, H.; OJEDA, S. R. Epigenetic regulation of female puberty. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 36, n., p. 90-107, 2015.

LOMNICZI, A.; OJEDA, S. R. The Emerging Role of Epigenetics in the Regulation of Female Puberty. **Endocrine Development**, v. 29, n., p. 1-16, 2016.

MAYER, E. A.; RYU, H. J.; BHATT, R. R. The neurobiology of irritable bowel syndrome. **Molecular Psychiatry**, v. 28, n. 4, p. 1451-1465, 2023.

MAZUCO, T. R. R.; BIONDI, T. F.; SILVA, E. P.; BERNARDI, M. M.; KIRSTEN, T. B. LPS-induced sickness behavior is not affected by selenium but is switched off by psychogenic stress in rats. **Veterinary Research Communications**, v. 43, n. 4, p. 239-247, 2019.

MEDEIROS, L. D. S.; RODRIGUES, P. D. S.; SANTOS, D. N. L.; SILVA-SAMPAIO, A. C.; KIRSTEN, T. B.; SUFFREDINI, I. B.; COQUE, A. C.; DA SILVA, R. A.; BERNARDI, M. M. Prenatal restraint stress downregulates the hypothalamic kisspeptidergic system transcripts genes, reduces the estrogen plasma levels, delayed the onset of puberty, and reduced the sexual behavior intensity in female rats. **Physiology & Behavior**, v. 260, n., p. 114055, 2023.

MICEVYCH, P.; SINCHAK, K. The Neurosteroid Progesterone Underlies Estrogen Positive Feedback of the LH Surge. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 2, n., p. 90, 2011.

MISSELWITZ, B.; BUTTER, M.; VERBEKE, K.; FOX, M. R. Update on lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and clinical management. **Gut**, v. 68, n. 11, p. 2080-2091, 2019.

MONG, J. A.; MCCARTHY, M. M. Steroid-induced developmental plasticity in hypothalamic astrocytes: implications for synaptic patterning. **Journal of Neurobiology**, v. 40, n. 4, p. 602-619, 1999.

MOREIRA, C. Regulação Hormonal dos Sistemas Reprodutores. **Revista de Ciência Elementar**, v. V3, n. 3, p. 166, 2015.

MOSCA, F.; GIANNI, M. L. Human milk: composition and health benefits. **Pediatr Med**

Chir, v. 39, n. 2, p. 155, 2017.

NAGPAUL, J. P.; KAUSHAL, M.; MAJUMDAR, S.; MAHMOOD, A. Effect of various doses of medroxyprogesterone acetate on intestinal functions in rats. **Indian J Gastroenterol**, v. 9, n. 1, p. 45-47, 1990.

NEI, M.; SAITOU, N. Genetic relationship of human populations and ethnic differences in reaction to drugs and food. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 214, n., p. 21-37, 1986.

PALMEIRA, P.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. Immunology of breast milk. **Rev Assoc Med Bras (1992)**, v. 62, n. 6, p. 584-593, 2016.

PANAY, N.; STUDD, J. W. The psychotherapeutic effects of estrogens. **Gynecol Endocrinol**, v. 12, n. 5, p. 353-365, 1998.

PASTUSZKA, R.; BARLOWSKA, J.; LITWINCZUK, Z. Allergenicity of milk of different animal species in relation to human milk. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, v. 70, n. 0, p. 1451-1459, 2016.

PEREIRA, E. S. A.; SOARES, J. R. A.; MATTOS, E. B. A.; JOSETTI, C.; GUIMARAES, I. M.; CAMPOS, S. M. N.; TEIXEIRA, G. A histomorphometric classification system for normal and inflamed mouse duodenum-Quali-quantitative approach. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 99, n. 4, p. 189-198, 2018.

PERINO, A.; CABRAS, S.; OBINU, D.; CAVALLI SFORZA, L. Lactose intolerance: a non-allergic disorder often managed by allergologists. **Eur Ann Allergy Clin Immunol**, v. 41, n. 1, p. 3-16, 2009.

SALOMON, R.; LEVY, E.; LEVESQUE, D.; SZILAGYI, A.; SEIDMAN, E. Caco-2 cell disaccharidase activities are unaffected by gestational hormones. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 74, n. 10, p. 1126-1131, 1996.

SAVAIANO, D. Lactose intolerance: an unnecessary risk for low bone density. **Nestle Nutrition Workshop Series Pediatric Program**, v. 67, n., p. 161-171, 2011.

SERRETTI, A.; DRAGO, A.; DE RONCHI, D. HTR2A gene variants and psychiatric disorders: a review of current literature and selection of SNPs for future studies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 19, p. 2053-2069, 2007.

SEYYEDIN, S.; NAZEM, M. N. Histomorphometric study of the effect of methionine on small intestine parameters in rat: an applied histologic study. **Folia Morphol (Warsz)**, v. 76, n. 4, p. 620-629, 2017.

SIBLEY, E. Genetic variation and lactose intolerance: detection methods and clinical implications. **Am J Pharmacogenomics**, v. 4, n. 4, p. 239-245, 2004.

SILVA, C. M.; SERAKIDES, R.; OLIVEIRA, T. S.; OCARINO, N. M.; NASCIMENTO, E. F.; NUNES, V. A. Histomorphometry and histochemistry of the ovaries, oviduct and uterus in hypothyroid rats in the metaestrus-diestrus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e**

Zootecnia, v. 56, n. 5, p. 628–639, 2004.

SINGH, D. K.; HARI DASS, S. A.; ABDULAI-SAIKU, S.; VYAS, A. Testosterone Acts Within the Medial Amygdala of Rats to Reduce Innate Fear to Predator Odor Akin to the Effects of *Toxoplasma gondii* Infection. **Front Psychiatry**, v. 11, n., p. 630, 2020.

SNARSKA, J.; FIEDOROWICZ, E.; ROZMUS, D.; WRONSKI, K.; LATA CZ, M.; KORDULEWSKA, N.; PLOMINSKI, J.; GRZYBOWSKI, R.; SVELKOUL, H. F. J.; KOSTYRA, E.; CIESLINSKA, A. TPH1 gene polymorphism rs211105 is associated with serotonin and tryptophan hydroxylase 1 concentrations in acute pancreatitis patients. **BMC Gastroenterol**, v. 21, n. 1, p. 426, 2021.

SWARTZ, W. J.; MATTISON, D. R. Galactose inhibition of ovulation in mice. **Fertility and Sterility**, v. 49, n. 3, p. 522-526, 1988.

SZILAGYI, A.; SALOMON, R.; MARTIN, M.; FOKEEFF, K.; SEIDMAN, E. Lactose handling by women with lactose malabsorption is improved during pregnancy. **Clin Invest Med**, v. 19, n. 6, p. 416-426, 1996.

TAAVELA, J.; VIIRI, K.; VALIMAKI, A.; SARIN, J.; SALONOJA, K.; MAKI, M.; ISOLA, J. Apolipoprotein A4 Defines the Villus-Crypt Border in Duodenal Specimens for Celiac Disease Morphometry. **Front Immunol**, v. 12, n., p. 713854, 2021.

TORO, C. A.; AYLWIN, C. F.; LOMNICZI, A. Hypothalamic epigenetics driving female puberty. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 30, n. 7, p. e12589, 2018.

UGIDOS-RODRIGUEZ, S.; MATA LLANA-GONZALEZ, M. C.; SANCHEZ-MATA, M. C. Lactose malabsorption and intolerance: a review. **Food Funct**, v. 9, n. 8, p. 4056-4068, 2018.

WALTHER, D. J.; BADER, M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 9, p. 1673-1680, 2003.

WITKOWSKA-ZIMNY, M.; KAMINSKA-EL-HASSAN, E. Cells of human breast milk. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 22, n., p. 11, 2017.

WYATT, A. K.; ZAVODNA, M.; VILJOEN, J. L.; STANTON, J. A.; GEMMELL, N. J.; JASONI, C. L. Changes in methylation patterns of *kiss1* and *kiss1r* gene promoters across puberty. **Genet Epigenet**, v. 5, n., p. 51-62, 2013.

XAVIER, J. G.; FAVERO, M. E.; VINOLO, M. A.; ROGERO, M. M.; DAGLI, M. L.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; BOROJEVIC, R.; BORELLI, P. Protein-energy malnutrition alters histological and ultrastructural characteristics of the bone marrow and decreases haematopoiesis in adult mice. **Histology and Histopathology**, v. 22, n. 6, p. 651-660, 2007.

ZAMANI, M.; ALIZADEH-TABARI, S.; ZAMANI, V. Systematic review with meta-analysis: the prevalence of anxiety and depression in patients with irritable bowel syndrome. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 50, n. 2, p. 132-143, 2019.

ZHU, J. Q.; ZHU, L.; LIANG, X. W.; XING, F. Q.; SCHATTEN, H.; SUN, Q. Y. Demethylation of LHR in dehydroepiandrosterone-induced mouse model of polycystic ovary

syndrome. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 4, p. 260-266, 2010.

ZURAWEK, D.; GRUCA, P.; ANTKIEWICZ-MICHALUK, L.; DZIEDZICKA-WASYLEWSKA, M. Resilient Phenotype in Chronic Mild Stress Paradigm Is Associated with Altered Expression Levels of miR-18a-5p and Serotonin 5-HT1a Receptor in Dorsal Part of the Hippocampus. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 11, p. 7680-7693, 2019.

ANEXOS

Anexo 1 – Certificado CEUA/UNIP



Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Intolerância à lactose, prejuízos na fertilidade feminina e seus mecanismos", protocolada sob o CEUA nº 8426191121 (ID 000761), sob a responsabilidade de **Thiago Berti Kirsten** e equipe; *Nathalia de Andrade Galvão; Rodrigo Augusto Silva; Tifany Vieira Rocha; Vanessa de Souza Ancim da Silva; Marcella Cristina Galvão* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista (CEUA/UNIP) na reunião de 14/02/2022.

We certify that the proposal "Lactose intolerance, impairments to female fertility and its mechanisms", utilizing 44 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 8426191121 (ID 000761), under the responsibility of **Thiago Berti Kirsten and team; Nathalia de Andrade Galvão; Rodrigo Augusto Silva; Tifany Vieira Rocha; Vanessa de Souza Ancim da Silva; Marcella Cristina Galvão** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Paulista University (CEUA/UNIP) in the meeting of 02/14/2022.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [04/2022](#) a [12/2024](#)

Área: [Patologia Ambiental E Experimental](#)

Origem: [Biotério de Experimentação](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [60 a 120 dias](#)

N: [44](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [180 a 350 g](#)

Local do experimento: Esses ratos serão alojados no Biotério de Experimentação da Universidade Paulista (São Paulo, SP).

São Paulo, 17 de fevereiro de 2022

Profa. Dra. Maria Martha Bernardi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Paulista

Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Paulista