

UNIVERSIDADE PAULISTA

**ESTUDO DE MODELOS EXPERIMENTAIS DE
INTOLERÂNCIA À LACTOSE EM RATOS:
RELAÇÃO COM DISTÚRBIOS
PSIQUIÁTRICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental.

MARCELLA CRISTINA GALVÃO

SÃO PAULO

2022



Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa



UNIVERSIDADE PAULISTA

**ESTUDO DE MODELOS EXPERIMENTAIS DE
INTOLERÂNCIA À LACTOSE EM RATOS:
RELAÇÃO COM DISTÚRBIOS
PSIQUIÁTRICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten

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

MARCELLA CRISTINA GALVÃO

SÃO PAULO

DEZEMBRO / 2022

Galvão, Marcella Cristina.

Estudo de modelos experimentais de intolerância à lactose em ratos: relação com distúrbios psiquiátricos / Marcella Cristina Galvão. - 2022. 63 f. : il. color. + CD-ROM.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2022.

Área de concentração: Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten.

1. Leite. 2. Não persistência de lactase. 3. Diarreia. 4. Dimorfismo sexual. 5. Monoaminas. I. Kirsten, Thiago Berti (orientador). II. Título.

MARCELLA CRISTINA GALVÃO

**ESTUDO DE MODELOS EXPERIMENTAIS DE
INTOLERÂNCIA À LACTOSE EM RATOS:
RELAÇÃO COM DISTÚRBIOS
PSIQUIÁTRICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutora 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 que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.
Mas o que seria o oceano se não infinitas gotas?”**

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten toda gratidão. Gratidão pela credibilidade depositada em mim, ainda na Iniciação Científica. Por toda confiança, parceria, orientação, paciência, compreensão e dedicação despendida. Agradeço por todos esses anos de orientação, por ter me recebido de braços abertos há 11 anos e compartilhado e ensinado tanto nesses longos anos. Muito obrigada! Sem você eu não teria chegado tão longe. Muito obrigada!

A Profa. Dra. Maria Martha pelos conselhos e orientações sempre tão sábias, pela inteligência que ilumina a todos nós.

Ao Prof. Rodrigo Augusto pelo auxílio e tempo disponibilizado para ensinar as técnicas para extração de RNA e DNA e pela paciência de tantos áudios longos;

As alunas do Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista: a doutoranda Nathalia Galvão, minha parceira nesse projeto, obrigada pelo seu empenho, dedicação e pelo seu profissionalismo. Ao mestrando Daniel, pelo auxílio, pela disponibilidade e gentileza. As alunas de Iniciação Científica Vanessa Ancim e Tiffany Rocha, por todo auxílio, empenho, amizade despendida. A participação de vocês foi crucial para realização do projeto.

Agradeço a Joyce e a técnica Suzana pela colaboração na obtenção de dados das análises de dopamina e por sempre estarem dispostas a nos auxiliar.

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, obrigada por me socorrer e me ajudar sempre, sem ressalvas.

Agradeço a Universidade Paulista também pelo apoio financeiro em forma de bolsa (desconto) na mensalidade do doutorado; auxílio fundamental para a execução deste curso.

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

Agradeço a Deus por ser tão generoso comigo, por ter colocado em meu caminho, pessoas que me iluminam. Obrigada, por nesta existência me permitir ser instrumento de sua vontade em exercer a caridade, em poder servir, cuidar, tratar e amar os animais. É uma dádiva poder diariamente estar em contato com esses seres angelicais.

Agradeço aos meus pais, pelo apoio, incentivo e por sempre acreditarem em mim, sem vocês não seria possível, vocês são o motivo pelo qual todos os dias eu luto por uma vida melhor, são a razão da minha existência. Tudo é por vocês. Amo vocês!

Agradeço ao meu namorado Raphael Villa Prando, por ouvir eu falar incessantemente sobre o doutorado, paciente em meus momentos de reclamação e desespero. Obrigada por tanto, que desde a Iniciação Científica, me apoia, auxilia e sempre disposto. Obrigada por sempre e incondicionalmente estar ao meu lado há tantos anos. Te amo!

Agradeço a minha madrinha Sandra Regina de Matos, que é a minha melhor amiga, meu porto seguro. Obrigada por compartilhar comigo essa existência e fazer dela muito mais feliz.

Agradeço todos os amigos e familiares, por me apoiarem, entenderem e por serem minha rede de apoio. O presente trabalho certamente não chegaria a sua fase final se estivesse nesta trajetória sozinha, dessa forma agradeço a todos que permaneceram ao meu lado nesta caminhada.

RESUMO

GALVÃO, M. C. **Estudo de modelos experimentais de intolerância à lactose em ratos: relação com distúrbios psiquiátricos**. Tese (Doutorado em Patologia Ambiental e Experimental) - Universidade Paulista, São Paulo, 2022. 63 f. Orientação: Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten

A intolerância à lactose afeta muitas pessoas, com sintomas como diarreia e dor abdominal. Os mecanismos ainda não foram elucidados e existem poucos modelos experimentais para seu estudo. Alguns estudos apontam para um efeito sexualmente dimórfico, além de maior predisposição a distúrbios psiquiátricos. Os objetivos deste trabalho foram de estudar e propor modelos experimentais de intolerância à lactose em ratos e ratas adultos, avaliando a manifestação de comportamentos relacionados a distúrbios psiquiátricos e a incidência em cada sexo. Além disso, buscou-se entender processos neurobiológicos envolvidos. Ratos e ratas Wistar adultos foram expostos por 14 dias consecutivos a dois tipos de dietas ricas em lactose: solução contendo 14% de lactose e fórmula comercial de leite rico em lactose. Foram monitorados os sinais clínicos: peso corporal, consumo das dietas e consistência das cúbicas fecais. Foram avaliados comportamentos relacionados a distúrbios psiquiátricos: teste da caixa claro-escuro (ansiedade), de preferência social e do nado forçado (depressão), bem como dosados os níveis de dopamina encefálicas. Os resultados revelaram que ambas as dietas foram bem aceitas e consumidas por ratos machos e fêmeas e prejudicaram a consistência das cúbicas fecais, com auge de efeito no 12º dia de exposição, em comparação aos dados dos grupos controles. A partir daí, os resultados foram sexualmente dimórficos. Os machos apresentaram comportamento ansiolítico após a dieta de lactose. A socialização dos machos foi prejudicada por ambas as dietas, principalmente após a fórmula comercial. O efeito ansiolítico e a redução na socialização nos ratos foram creditados ao papel modulador das dietas ricas em lactose no sistema dopaminérgico. Já nas fêmeas, a dieta rica em lactose reduziu os níveis de dopamina cortical, que resultou em efeito ansiogênico. Concluindo, os presentes achados revelaram que ambas as dietas ricas em lactose (lactose 14% e fórmula comercial) induziram sinais clínicos de intolerância a lactose em ratos machos e fêmeas, acompanhados de prejuízos comportamentais associados a distúrbios psiquiátricos que foram explicados pela modulação dopaminérgica. Propõe-se assim, dois modelos experimentais de intolerância a lactose.

Palavras-chave: Leite; Não persistência de lactase; Diarreia; Dimorfismo sexual; Monoaminas.

ABSTRACT

GALVÃO, M. C. **Study of experimental models of lactose intolerance in rats: relationship with psychiatric disorders.** PhD Thesis (Environmental and Experimental Pathology) - Paulista University, São Paulo, 2022. 63 p. Advisor: Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten

Lactose intolerance presents high incidence, with symptoms such as diarrhea and abdominal pain. The mechanisms have not yet been elucidated and there are few experimental models for their study. Some studies point to a sexually dimorphic effect, in addition to a greater predisposition to psychiatric disorders. The objectives of this study was to propose experimental models of lactose intolerance in adult male and female rats, evaluating the manifestation of behaviors related to psychiatric disorders and the incidence in each sex. Moreover, it was objective to elucidate the neurobiological processes involved. Adult Wistar male and female rats were exposed for 14 consecutive days to two types of diets rich in lactose: a solution containing 14% lactose and a commercial formula of milk rich in lactose. Clinical signs were monitored: body weight, consumption of diets and stool consistency. Behaviors related to psychiatric disorders were evaluated: light-dark box (anxiety), social preference and forced swimming (depression) tests, as well as evaluating brain dopamine levels. The results revealed that both diets were well accepted and consumed by male and female rats and impaired the stool consistency, with a peak effect on the 12th day of exposure, compared with data of control groups. From there, the results were sexually dimorphic. Males presented anxiolytic behavior after the lactose diet. The socialization of males was impaired by both diets, especially after the commercial formula. The anxiolytic effect and reduction in socialization in rats were credited to the modulating role of lactose-rich diets on the dopaminergic system. In females, the lactose-rich diet reduced cortical dopamine levels, which resulted in an anxiogenic effect. In conclusion, the present findings revealed that both lactose-rich diets (14% lactose and commercial formula) induced clinical signs of lactose intolerance in male and female rats, accompanied by behavioral impairments associated with psychiatric disorders that were explained by dopaminergic modulation. Thus, two experimental models of lactose intolerance were proposed.

Keywords: Milk; Lactase non-persistence; Diarrhea; Sexual dimorphism; Monoamines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aparatos comportamentais. Aparatos comportamentais utilizados para as avaliações individuais dos ratos machos e fêmeas expostos a dietas ricas em lactose (lactose 14% e fórmula comercial) ao longo de 14 dias. Avaliações comportamentais realizadas no décimo quinto dia. (A) Teste da caixa claro-escuro, (B) teste de preferência social e (C) teste do nado forçado 27

Figura 2 – 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 cibalas fecais em ratos machos e fêmeas adultos. As avaliações ocorreram a cada 48h: dias (d) 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 (n = 8 ratos/grupo). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ (ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey para o peso corporal, ANOVA de três vias seguido do pós-teste de Tukey para o consumo das dietas e teste de Kruskal-Wallis para o escore de cibalas fecais). Diferentes símbolos representam diferenças encontradas entre os grupos: (@) lactose macho vs. lactose fêmea, (^) fórmula macho vs. fórmula fêmea, (+) lactose macho vs. fórmula macho, (~) lactose fêmea vs. fórmula fêmea, (%) lactose macho vs. respectivo controle, (♦) fórmula macho vs. respectivo controle, (&) lactose fêmea vs. respectivo controle e (\$) fórmula fêmea vs. respectivo controle. Os resultados são expressos como média e respectivos erros-padrão 32

Figura 3 – Teste da caixa claro-escuro. Efeitos de dietas ricas em lactose (lactose 14% e fórmula comercial) ao longo de 14 dias quanto ao comportamento observado pelo teste da caixa claro-escuro em ratos machos (barras verdes) e fêmeas (barras rosas) adultos. A avaliação foi realizada 24 horas após o encerramento da exposição às dietas. Os parâmetros avaliados foram: (A) latência para entrar no lado escuro, (B) número de tentativas de entrada no lado claro, (C) tempo de permanência no lado escuro e (D) frequência de levantar (n = 8 ratos/grupo). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ (ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey). Diferentes símbolos representam diferenças encontradas entre os grupos: (*) vs. seu respectivo controle. Os resultados são expressos como *box & whiskers*, mostrando todos os valores 36

Figura 4 – Teste de preferência social. Efeitos de dietas ricas em lactose (lactose 14% e fórmula comercial) ao longo de 14 dias quanto ao comportamento observado pelo teste de preferência social em ratos machos (barras verdes) e fêmeas (barras rosas) adultos. A avaliação foi realizada 24 horas após o encerramento da exposição às dietas. Os parâmetros avaliados foram: (A) latência para iniciar a interação social com o rato desconhecido, (B) tempo de interação social direta, (C) tempo gasto na câmara vazia, (D) número de entradas na câmara vazia, (E) tempo gasto na câmara com o rato desconhecido e (F) número de entradas na câmara com o rato desconhecido (n = 8 ratos/grupo). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ (ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey). Diferentes símbolos representam diferenças encontradas entre os grupos: (*) vs. seu respectivo controle e (#) lactose vs. fórmula. Os resultados são expressos como *box & whiskers*, mostrando todos os valores 38

Figura 5 – Teste do nado forçado. Efeitos de dietas ricas em lactose (lactose 14% e fórmula comercial) ao longo de 14 dias quanto ao comportamento observado pelo teste do nado forçado em ratos machos (barras verdes) e fêmeas (barras rosas) adultos. A avaliação foi realizada 24 horas após o encerramento da exposição às dietas. Os parâmetros avaliados foram: (A) latência para a primeira imobilidade, (B) tempo total de imobilidade e (C) tempo total de escalada (n = 8 ratos/grupo). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$ (ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey). Diferentes símbolos representam diferenças encontradas entre os grupos: (#) lactose vs. fórmula. Os resultados são expressos como *box & whiskers*, mostrando todos os valores..... 40

Figura 6 – Dopamina encefálica. Efeitos de dietas ricas em lactose (lactose 14% e fórmula comercial) ao longo de 14 dias quanto aos níveis encefálicos de dopamina em ratos machos (barras verdes) e fêmeas (barras rosas) adultos. A avaliação foi realizada 24 horas após o encerramento da exposição às dietas. As áreas encefálicas avaliadas foram: (A) estriado e (B) córtex frontal, ambas pela técnica de ELISA (n = 8 ratos/grupo). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ (ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey). Diferentes símbolos representam diferenças encontradas entre os grupos: (*) vs. seu respectivo controle. Os resultados são expressos como *box & whiskers*, mostrando todos os valores 41

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Concentração de lactose. Concentração de lactose no leite de algumas espécies | 14 |
|---|----|

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA | 13 |
| 1.1 Consumo de leite e intolerância à lactose | 13 |
| 1.2 Modelos de intolerância à lactose em animais de laboratório | 17 |
| 1.3 Microbiota intestinal na intolerância à lactose..... | 19 |
| 2. OBJETIVOS..... | 22 |
| 2.1 Objetivo geral | 22 |
| 2.2 Objetivos específicos | 22 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 23 |
| 3.1 Declaração de ética | 23 |
| 3.2 Animais..... | 23 |
| 3.3 Soluções, dietas, grupos e delineamento experimental..... | 24 |
| 3.4 Monitoramento de sinais clínicos | 26 |
| 3.5 Teste da caixa claro-escuro..... | 26 |
| 3.6 Teste de preferência social..... | 28 |
| 3.7 Teste do nado forçado..... | 29 |
| 3.8 Dopamina encefálica..... | 29 |
| 3.9 Análises estatísticas | 30 |
| 3.10 Próximos passos..... | 30 |
| 4. RESULTADOS | 31 |
| 4.1 Monitoramento de sinais clínicos | 31 |
| 4.2 Teste da caixa claro-escuro..... | 34 |
| 4.3 Teste de preferência social..... | 36 |
| 4.4 Teste do nado forçado..... | 39 |
| 4.5 Dopamina encefálica..... | 40 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 42 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 49 |
| REFERÊNCIAS | 50 |
| ANEXOS..... | 63 |
| Anexo 1 – Certificado de aprovação do Projeto junto a CEUA/UNIP..... | 63 |

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Esta seção aborda assuntos disponíveis na literatura especializada relacionados ao consumo de leite e intolerância à lactose, a modelos de intolerância à lactose em animais de laboratório e a microbiota intestinal na intolerância à lactose. 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 fluido viscoso, de cor esbranquiçada, composto por macronutrientes como carboidratos (como a lactose), proteínas, lipídios, vitaminas (por exemplo, A, D, B9 e B12), 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 um importante aliado para o fornecimento de nutrientes e para a manutenção da saúde.

A **Tabela 1** demonstra a concentração de lactose no leite materno de diversas 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 organismo do 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 humanos têm lactase suficiente para digerir cerca de um litro de leite materno por dia (d) (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).

Tabela 1 – Concentração de lactose. Concentração de lactose no leite de algumas espécies

| Espécie | Lactose (%) no leite materno |
|------------------|-------------------------------------|
| Asna | 7,4 |
| Chimpanzé | 7,0 |
| Humano | 6,9-7,2 |
| Égua | 6,2 |
| Porca | 5,5 |
| Ovelha | 4,8 |
| Gata doméstica | 4,8 |
| Aliá indiana | 4,7 |
| Vaca | 4,6-4,8 |
| Cabra | 4,1 |
| Cadela doméstica | 3,1 |
| Camundongo | 3,0 |
| Coelha doméstica | 2,1 |
| Rata | 1,1-2,6 |
| Ursa preta | 0,4 |

Fonte: adaptado (FOX; MCSWEENEY, 1998; PASTUSZKA; BARLOWSKA; LITWINCZUK, 2016; ALVES DA CUNHA et al., 2020)

O início do consumo humano do leite de outras espécies ocorreu há muito tempo. 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, 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; AL-TORKI, 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 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 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 abdominal, flatulência e dor abdominal (SIBLEY, 2004; DENG et al., 2015). A intolerância à lactose depende não apenas da expressão da lactase, mas também da dose de lactose, da microbiota intestinal, da motilidade gastrointestinal, do supercrescimento bacteriano do intestino delgado e da

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 além da dieta reduzida em lactose a reposição enzimática (PERINO et al., 2009; DENG et al., 2015).

Estima-se que 70% da população mundial sofra da não persistência de lactase, que é a causa fisiológica primária da intolerância à lactose (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 descritos classicamente como os mais acometidos pela intolerância à lactose (BARR, 2013; BAADKAR; MUKHERJEE; LELE, 2014). 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 a intolerância à lactose ainda não foi descrita, embora tenha-se 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).

Interessantemente, existem relatos de maior predisposição a distúrbios psiquiátricos em mulheres com intolerância à lactose, incluindo a ansiedade e a depressão. 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 a depressão (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 (THP) 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 disso, outros estudos demonstram que neurônios dopaminérgicos entéricos recebem inervação serotoninérgica. Os neurônios dopaminérgicos dependem da inervação para seu desenvolvimento e sobrevivência (LI, Z. et al., 2011). Muitos distúrbios psiquiátricos também estão associados com disfunção do sistema dopaminérgico (POST; SULZER, 2021).

1.2 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 dose alta de lactose: 25 g/60 kg de peso corporal. 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 (LI, J. et al., 2012). Nesse estudo, os camundongos também 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 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; fenômeno similar ao que ocorre com os humanos adultos (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 e também receberam a shen-ling-bai-zhu-san, um composto de ervas utilizado desde a antiguidade pela medicina tradicional chinesa (JI et al., 2019). Vários parâmetros foram avaliados, desde 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 a 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 ver, ainda existem muitos estudos a serem realizados para estabelecer modelos experimentais confiáveis e para entender os mecanismos associados e desdobramentos da intolerância à lactose.

1.3 Microbiota intestinal na intolerância à lactose

O estudo do microbioma intestinal tem revelado relação entre a saúde gastrointestinal com aspectos mentais e distúrbios psiquiátricos (PEIRCE; ALVINA, 2019). Os mecanismos de ação e de correlação do eixo intestino–cérebro ainda não foram plenamente esclarecidos. Esse eixo é uma rede densa que une uma série de vias fisiológicas fundamentais, como o sistema nervoso central, os sistemas neuroendócrino e imunológico, bem como componentes simpáticos e parassimpáticos do sistema autônomo e o sistema nervoso entérico. O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal também desempenha um papel central ao lado do eixo intestino–cérebro em muitos distúrbios relacionados ao estresse (SIMIONESCU et al., 2020). Assim, o microbioma intestinal é capaz de modular diversas respostas no organismo do indivíduo, como alterar parâmetros imunológicos, desencadear doenças crônicas, infertilidade, doenças psíquicas e alterações comportamentais (SIMIONESCU et al., 2020).

As bactérias intestinais se comunicam com o sistema nervoso central por meio de canais de sinalização neurais, endócrinos e imunológicos. Mudanças na diversidade e abundância relativa da microbiota e metabólitos microbianos estão associados a uma ampla gama de distúrbios neurológicos. Estudos recentes correlacionam a microbiota intestinal com desenvolvimento de distúrbios como autismo, ansiedade, obesidade, esquizofrenia, doença de Parkinson e doença de Alzheimer. Modelos animais têm sido essenciais para vincular a regulação de processos neurais fundamentais no microbioma (CENIT; SANZ; CODONER-FRANCH, 2017; CRYAN et al., 2019). Sabe-se que processos neurais centrais fundamentais, incluindo desenvolvimento, mielinização, neurogênese e ativação da microglia, demonstraram ser dependentes da composição da microbiota (BRANISTE et al., 2014; ERNY et al., 2015; CHU et al., 2019).

Embora as bactérias sejam os microrganismos intestinais mais abundantes e mais bem estudados, a multiplicidade de leveduras, eucariotos unicelulares, helmintos parasitas e vírus também estão sendo considerados. Contudo, o papel que esses outros microrganismos

desempenham na microbiota–intestino com interações encefálicas é atualmente pouco conhecida (MARGOLIS; CRYAN; MAYER, 2021).

Certas bactérias são especificamente capazes de modular diferentes neurotransmissores essenciais e neuromoduladores específicos. Alguns neurotransmissores como o ácido gama-aminobutírico (GABA), serotonina, catecolaminas e acetilcolina são produzidos por bactérias, algumas das quais são habitantes do intestino humano. Estudos demonstram que os *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. produzem GABA e acetilcolina (BARRETT et al., 2012; DINAN; STANTON; CRYAN, 2013). Os neurotransmissores secretados por bactérias no lúmen intestinal podem induzir as células epiteliais a liberar moléculas que, por sua vez, têm a capacidade de modular a sinalização neural dentro do sistema nervoso entérico e, posteriormente, controlar a função e o comportamento do encéfalo (BERCIK et al., 2011). Estudos sobre probióticos, incluindo cepas de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, demonstraram amenizar sintomas em adultos e crianças com doença inflamatória intestinal (HORVATH; DZIECHCIARZ; SZAJEWSKA, 2011; SU et al., 2020). O gênero *Bifidobacterium* é composto por 80 subespécies, que abrangem o trato gastrointestinal de humanos, mamíferos não humanos, aves e insetos, águas residuais e a cavidade oral. Bifidobactérias conduzem funções importantes em termos de preparação do sistema imunológico, melhorando a camada de muco e modulando o estabelecimento de uma homeostase correta da microbiota. Além disso, possuem atividades benéficas, incluindo características antibacterianas contra patógenos como *Helicobacter pylori* (CHENOLL et al., 2011), diminuição de apoptose na mucosa intestinal de bebês prematuros afetados por enterocolite necrosante (KHAILOVA et al., 2010), modulação do hospedeiro e sistema imunológico (FU et al., 2010) e alívio das atividades inflamatórias associadas a certas disfunções intestinais crônicas (GUGLIELMETTI et al., 2011).

Várias espécies e cepas de *Lactobacilli* foram relacionadas como o probióticos mais proeminente do grupo de bactérias do ácido láctico (AZAD et al., 2018). *Lactobacillus* comensais podem restaurar a homeostase em distúrbios intestinais e, assim, desempenhar um papel protetor contra doenças inflamatórias (AZAD et al., 2018). Além disso, com base na modulação de linfócitos T reguladores e resposta imune com viés Th17 em citocinas reguladoras, a cepa probiótica de *Lactobacillus* spp. demonstra efeitos benéficos na prevenção do câncer e inflamação intestinal (LENOIR et al., 2016).

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 foi avaliada a 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).

Por tudo citado até aqui, como a alta incidência da intolerância à lactose e as limitações dos conhecimentos relacionados aos seus mecanismos de ação e aos modelos experimentais, os objetivos deste projeto foram de estudar e propor modelos experimentais de intolerância à lactose em ratos e ratas adultos, avaliando a manifestação de comportamentos relacionados a distúrbios psiquiátricos e a incidência em cada sexo. Além disso, buscou-se entender os processos neurobiológicos envolvidos.

2. OBJETIVOS

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

2.1 Objetivo geral

Estudar e propor modelos experimentais de intolerância à lactose em ratos e ratas adultos, avaliando a manifestação de comportamentos relacionados a distúrbios psiquiátricos e a incidência em cada sexo. Além disso, foi objetivo entender os processos neurobiológicos envolvidos.

2.2 Objetivos específicos

- Induzir intolerância à lactose em ratos e ratas adultos com o fornecimento de diferentes dietas ricas em lactose (solução de 14% de lactose e fórmula comercial);
- Avaliar em ratos e ratas adultos a manifestação de sinais relacionados a intolerância à lactose (escore das cíbalas fecais e monitoramento de sinais clínicos);
- Avaliar em ratos e ratas adultos se o modelo resulta em prejuízos comportamentais relacionados à ansiedade (teste da caixa claro-escuro);
- Avaliar em ratos e ratas adultos se o modelo resulta em prejuízos comportamentais relacionados à socialização (teste de preferência social);
- Avaliar em ratos e ratas adultos se o modelo resulta em prejuízos comportamentais relacionados à depressão (teste do nado forçado);
- Avaliar em ratos e ratas adultos se o modelo está relacionado a modulações nos níveis de dopamina encefálico;
- Avaliar em ratos e ratas adultos eventual dimorfismo sexual em todos os parâmetros fisiológicos, comportamentais e centrais estudados;
- Propor modelo experimental de intolerância à lactose em ratos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção, são apresentados os procedimentos éticos e legais, informações relativas aos animais utilizados no estudo, sobre as soluções, dietas, grupos e delineamento experimental e detalhes sobre as avaliações relativas ao monitoramento de sinais clínicos, teste da caixa claro-escuro, teste de preferência social, teste do nado forçado, dosagem de dopamina encefálica e as análises estatísticas realizadas. Por fim, são apresentados os próximos passos previstos para esta pesquisa.

3.1 Declaração de ética

Este projeto foi submetido para a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNIP) e só foi iniciado experimentalmente após sua aprovação, sob número 3308170621. Os procedimentos estão de acordo com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório. 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 utilizados 48 *Rattus norvegicus* Wistar; desses 24 machos e 24 fêmeas, todos adultos, com aproximadamente 90 dias de vida, fornecidos pelo biotério credenciado de produção de ratos da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil). Esses ratos foram alojados no Biotério de Experimentação da Universidade Paulista (São Paulo, Brasil). 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 tiveram 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 Soluções, dietas, grupos e delineamento experimental

Para induzir características de intolerância à lactose em ratos e ratas adultos foram fornecidos dois diferentes tipos de dietas ricas em lactose. Assim, pode-se investigar qual alcançaria mais sucesso em mimetizar a intolerância à lactose e eventualmente propor um modelo experimental.

A primeira dieta utilizou uma solução de 14% de lactose. Como demonstrado na **Tabela 1**, a concentração de 14% de lactose é considerada alta para qualquer leite encontrado entre os mamíferos, especialmente para ratos, que tem 1,1-2,6% de lactose no leite. 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).

Essa solução foi confeccionada a partir do sal puro de lactose (lactose monoidratada, U.S.P. 40, Nro. CAS 10039-26-6, Labsynth Ltda, Diadema, Brasil) diluída em água filtrada fornecida para criação dos roedores. Para sua confecção, a solução foi aquecida em banho-maria a 93,5°C por 30 minutos, baseados em conceitos prévios encontrados na literatura a respeito das características físico-químicas do leite (FOX; MCSWEENEY, 1998), bem como em ensaios prévios realizados em nossos laboratórios (ROCHA; SILVA; KIRSTEN, 2022).

A segunda dieta utilizou uma solução de fórmula comercial de leite em pó para uso infantil de segmento para lactantes rico em lactose: Aptamil 2 Premium (Danone, Buenos Aires, Argentina). Informações nutricionais fornecidas na bula do produto detalham uma concentração de 53% de lactose na fórmula. A solução foi confeccionada seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante, com 210 mL de água filtrada 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 ratos e ratas baseados no estudo de Ji e colaboradores (2019), explicado anteriormente. As soluções eram diariamente confeccionadas e repostas. A solução

de lactose permanecia por 24 horas a disposição dos roedores, uma vez que nossos estudos prévios atestaram sua preservação por até sete dias (ROCHA; SILVA; KIRSTEN, 2022). No caso da fórmula comercial, a solução era fornecida para os ratos e ratas somente em um intervalo de 6 horas por dia, de modo a minimizar a possibilidade de deterioração.

Assim, os ratos e ratas foram divididos em um total de seis grupos (n=8 ratos por grupo):

- 1) machos controle: ratos mantidos com ração padrão e água filtrada (descritos no item anterior);
- 2) machos lactose: fornecido dieta com solução de 14% de lactose para ratos por 14 dias seguidos;
- 3) machos fórmula: fornecido dieta com solução de fórmula comercial rica em lactose para ratos por 14 dias seguidos;
- 4) fêmeas controle: ratas mantidas com ração padrão e água filtrada (descritos no item anterior);
- 5) fêmeas lactose: fornecido dieta com solução de 14% de lactose para ratas por 14 dias seguidos;
- 6) fêmeas fórmula: fornecido dieta com solução de fórmula comercial rica em lactose para ratas por 14 dias seguidos;

Todos os grupos experimentais com dietas ricas em lactose (lactose e fórmula para machos e fêmeas) tiveram ao longo dos 14 dias livre acesso também a ração padrão e água filtrada, conforme fornecido ao grupo controle.

Ao longo dos 14 dias de fornecimento das dietas ricas em lactose (e respectivos controles), todos os seis grupos de ratos foram monitorados quanto a sinais clínicos. O monitoramento ocorreu a cada 48h a partir do primeiro dia de dieta, até o último dia de experimento. No dia seguinte ao término dos protocolos de dieta, isto é, no 15º, os ratos foram avaliados seguidamente para os testes comportamentais: caixa claro-escuro, de preferência social e do nado forçado. Ao término da bateria de testes comportamentais, cada rato foi submetido à eutanásia para coleta de seus encéfalos e consequente dosagem dos níveis de dopamina.

Todas as avaliações nos ratos, incluindo monitoramento clínico, testes comportamentais e coleta de tecidos foram realizada sempre no período da tarde, entre 14h00 e 17h00, para minimizar variações induzidas por alterações no ritmo circadiano dos ratos.

3.4 Monitoramento de sinais clínicos

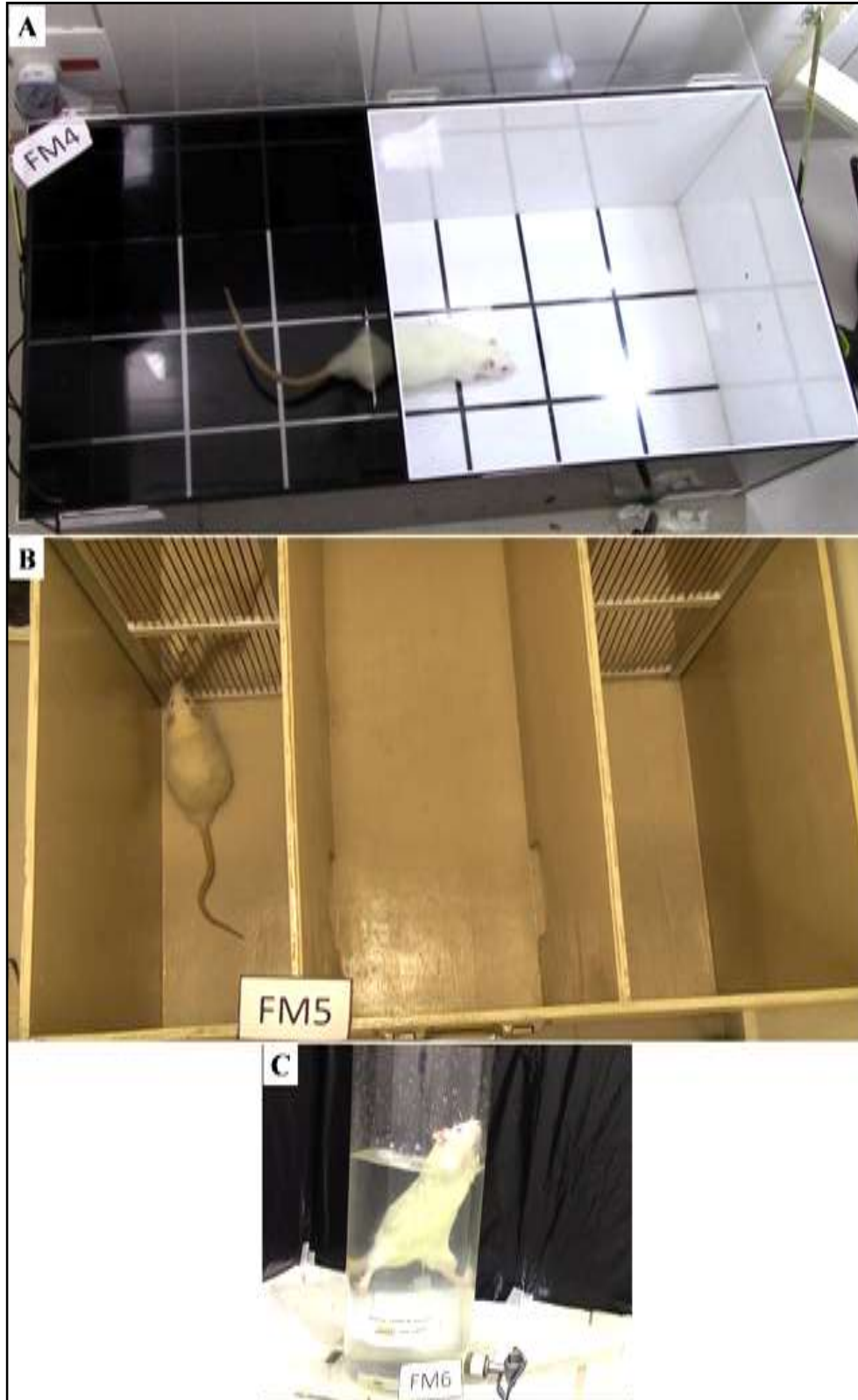
Todos os ratos dos seis grupos foram avaliados quanto ao monitoramento de sinais clínicos a cada 48h a partir do primeiro dia de dieta, até o último dia de experimento, isto é, nos dias 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14. Os parâmetros avaliados foram: peso corporal (g), consumo das dietas (soluções, mL) e escore de cibalas fecais. A análise da consistência das cibalas fecais foi baseada em escores de 1 a 4, adaptado do estudo de Akhtar e colaboradores (2021). O escore 1 referiu-se a cibalas fecais com consistência normal (firmes e duras); o escore 2 correspondeu a cibalas fecais em formato alongado, levemente amolecido; o escore 3 correspondeu a cibalas fecais amolecidas; e o escore 4 correspondeu a cibalas fecais aquosas (diarreia).

3.5 Teste da caixa claro-escuro

O primeiro teste comportamental avaliado no 15º dia de experimento foi o teste da caixa claro-escuro que visa o estudo de comportamento tipo-ansiedade, segundo nossos protocolos experimentais (PARISI et al., 2019). Esse modelo baseia-se na aversão inata de roedores a locais claros, gerando um conflito inerente entre o impulso exploratório em um ambiente novo e a prevenção do local menos protegido. O aparelho consistiu em uma caixa de acrílico (80 cm de comprimento, 40cm de largura, 30 cm de altura) contendo dois compartimentos (separados por uma abertura de 13x8cm): lado escuro com pisos pretos (34 cm de comprimento) e lado claro com paredes e pisos brancos (44cm de comprimento) iluminado com lâmpada branca (Led 9W, 6000K, **Figura 1A**). Cada rato foi colocado individualmente no centro do lado claro de frente a parede oposta à porta.

Cada rato foi avaliado por 5 minutos (sessões gravadas por filmadoras digitais localizadas acima da arena). Os parâmetros avaliados foram: latência (s) para a entrada no lado escuro, tempo total (s) gasto no lado claro, tempo total (s) gasto no lado escuro, e frequência total de levantar. A sala de testes era isolada do experimentador e com pouca iluminação. O aparato era limpo com solução álcool/água 5% antes de introduzir cada rato na arena, para eliminar possíveis traços de odor deixados pelos outros animais que poderiam interferir no comportamento.

Figura 1 – Aparatos comportamentais. Aparatos comportamentais utilizados para as avaliações individuais dos ratos machos e fêmeas expostos a dietas ricas em lactose (lactose 14% e fórmula comercial) ao longo de 14 dias. Avaliações comportamentais realizadas no décimo quinto dia. (A) Teste da caixa claro-escuro, (B) teste de preferência social e (C) teste do nado forçado



Fonte: dos autores

3.6 Teste de preferência social

Imediatamente após o teste da caixa claro-escuro, foi realizado o teste de preferência social, segundo nossos protocolos experimentais (CARDOSO et al., 2020). Resumidamente, foi utilizada uma arena de madeira pintada com tinta acrílica lavável de 70 cm de comprimento x 70 cm de largura x 50 cm de altura (**Figura 1B**). A arena era dividida em três compartimentos: um central de 25 cm de largura e dois compartimentos laterais com 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. Na extremidade mais distante da porta, cada compartimento lateral possuía uma subdivisão (21 cm de comprimento x 21,5 cm de largura) por meio de uma barreira aramada de metal. Essa barreira tinha a função de alocar um rato estímulo dentro de uma das subdivisões (aleatoriamente), de modo a permitir comunicação visual e olfatória (sem contato físico) entre ratos. A outra subdivisão permanecia vazia durante a execução do teste.

O teste consistiu em introduzir individualmente e gentilmente os sujeitos experimentais no compartimento central da arena que possuía um rato estímulo de mesmo sexo do sujeito experimental na subdivisão de um dos compartimentos laterais. Os rato(a)s estímulos tinham a mesma idade dos sujeitos experimentais (variação de até 5 dias de vida) e eram substituídos ao término de cada teste. Os sujeitos experimentais foram avaliados por cinco minutos em sala pequena isolada do experimentador, com isolamento acústico e luz indireta. Todas as sessões foram filmadas por equipamento alocado acima da arena.

Todos os sujeitos experimentais foram submetidos a uma sessão de 5 minutos de aclimatação ao aparato de avaliação da preferência social no dia anterior ao teste, isto é, no décimo quarto dia de experimento. Assim, o ambiente não era mais novidade para os ratos, de modo a permitir maior foco para a interação social.

Os parâmetros avaliados no teste foram: a latência para a primeira interação social direta (≤ 1 cm com o rato estímulo), o tempo total (em segundos) gasto com interação social (≤ 1 cm com o rato estímulo, considerando somente ações diretas e ativas para com o rato estímulo), o tempo de permanência no compartimento vazio (sem rato estímulo), o número de entradas (com as quatro patas) no compartimento vazio, o tempo de permanência no compartimento com o rato estímulo e o número de entradas (com as quatro patas) no compartimento com o rato estímulo. O aparato era limpo com solução álcool/água 5% antes

de introduzir cada rato na arena, para eliminar possíveis traços de odor deixados pelos outros animais que poderiam interferir no comportamento.

3.7 Teste do nado forçado

Imediatamente após o teste da preferência social, os ratos foram submetidos ao teste de nado forçado, o qual estuda o comportamento tipo-depressivo, segundo protocolos experimentais executados em nossos laboratórios (MORAES et al., 2017). Resumidamente, cada rato foi gentilmente introduzido em um cilindro acrílico redondo (46 cm de altura, 20 cm de diâmetro) contendo 30 cm de água a 23°C+1 e sessões individuais de 6 minutos foram filmadas (**Figura 1C**). Os seguintes parâmetros foram avaliados: latência (em segundos) para a primeira imobilidade, tempo total (em segundos) de imobilidade e o tempo total (em segundos) de tentativas de escaladas nas paredes do cilindro. O teste foi realizado em sala pequena, isolada do experimentador, com isolamento acústico e luz indireta. Todas as sessões foram filmadas por equipamento alocado em frente ao cilindro.

A água do aparato era trocada a cada sessão, para evitar resíduos olfativos. Foi considerado imobilidade, quando houve ausência de movimento ativo, ou seja, quando o animal não nadou ou escalou, mantendo-se apenas flutuante ou realizando apenas movimentos mínimos para manter a narina fora da água.

3.8 Dopamina encefálica

Imediatamente após o teste de nado forçado, os ratos foram submetidos à eutanásia por decapitação para a coleta do encéfalo. O método foi escolhido em detrimento da quantificação de neurotransmissores e foi aprovado junto a CEUA-UNIP. As áreas selecionadas e separadas para o estudo dopaminérgico encefálico foram o estriado e o córtex frontal pelo fato de serem áreas envolvidas com processos de depressão e ansiedade (MORAES et al., 2017; WANG et al., 2019; GOKDEMIR et al., 2020). A técnica empregada para a dosagem de dopamina foi por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), seguindo as instruções do manual do fabricante. Resumidamente, as estruturas encefálicas foram processadas com solução tampão fosfato-salino (PBS), maceradas, centrifugadas (3.500 RPMs, 15 minutos) e o sobrenadante diluído 1:10 em PBS. Foi utilizado kit comercial de dopamina (cat. no. MBS774549,

MyBioSource, San Diego, USA). Os resultados obtidos da leitura em densidade ótica foram convertidos e são expressos em pg/mL.

3.9 Análises estatísticas

Foram verificadas a homocedasticidade e a normalidade dos dados (testes de Bartlett, F e Shapiro-Wilk). Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias (fatores: dieta e sexo), seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey para comparar dados paramétricos entre os seis grupos. Também foi utilizada a ANOVA de três vias (fatores: dieta e sexo e dias de exposição), seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey para comparar dados paramétricos entre os seis grupos ao longo dos dias de exposição das dietas. Para o escore de cíbalas fecais, um parâmetro não-paramétrico, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. 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.

3.10 Próximos passos

Simultaneamente a coleta de encéfalos, as porções proximal e distal do intestino desses ratos também foram coletadas e processadas para análise microbiana. Os intestinos serão avaliados tanto morfológicamente a partir da confecção de lâminas histológicas, como por técnicas moleculares e epigenéticas. Está planejada a análise de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp por meio da técnica de qPCR a fim de avaliar a carga total dos gêneros presentes nas amostras de lavado intestinal. Como explicado na Introdução deste trabalho, estas bactérias potencialmente devem estar relacionadas a processos modulatórios imunológicos e neurológicos e podem auxiliar no entendimento dos processos relacionados a intolerância à lactose. Além disso, está previsto o estudo da expressão gênica do TPH1 e sua metilação, também justificado anteriormente de potencial relação com mecanismos relacionados a intolerância à lactose.

4. RESULTADOS

Nesta seção, são apresentados os resultados relativos aos estudos: de monitoramento de sinais clínicos, do teste da caixa claro-escuro, do teste de preferência social, do teste do nado forçado e das dosagens de dopamina encefálica.

Os resultados revelaram que ambas as dietas foram bem aceitas e consumidas por ratos machos e fêmeas e prejudicaram a consistência das ciberias fecais, com auge de efeito no 12º dia de exposição, em comparação aos dados dos grupos controles. A partir daí, os resultados foram sexualmente dimórficos. Os machos apresentaram comportamento ansiolítico após a dieta de lactose. A socialização dos machos foi prejudicada por ambas as dietas, principalmente após a fórmula comercial. O efeito ansiolítico e a redução na socialização nos ratos foram creditados ao papel modulador das dietas ricas em lactose no sistema dopaminérgico. Já nas fêmeas, a dieta rica em lactose reduziu os níveis de dopamina cortical, que resultou em efeito ansiogênico.

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

Os dois modelos experimentais de intolerância à lactose propostos e estudados, isto é, a exposição a dietas ricas em lactose por meio de solução de lactose 14% e fórmula comercial resultaram em achados expressivos e diferentes entre os sexos e avaliações. Em comum, ambas as dietas foram bem aceitas e consumidas por ratos machos e fêmeas e prejudicaram a consistência das cı́balas fecais, com auge de efeito no décimo segundo dia de exposição. Porém, a partir daı́, os resultados tenderam a efeitos sexualmente dimórficos. Os machos apresentaram comportamento ansiolı́tico após a dieta de lactose. A socialização dos machos foi prejudicada por ambas as dietas, embora com efeito mais expressivo após a fórmula comercial. O efeito ansiolı́tico e a redução na socialização nos ratos foram creditados ao papel modulador das dietas ricas em lactose no sistema dopaminérgico. Já nas fêmeas, a dieta rica em lactose reduziu os nı́veis de dopamina cortical, que resultou em efeito ansiogênico. Concluindo, os presentes achados revelaram que ambas as dietas ricas em lactose (lactose 14% e fórmula comercial) induziram sinais clı́nicos de intolerância a lactose em ratos machos e fêmeas, acompanhados de prejuı́zos comportamentais associados a distúrbios psiquiátricos que foram explicados pela modulação dopaminérgica. Propõe-se assim, dois modelos experimentais de intolerância a lactose.

REFERÊNCIAS

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.

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.

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.

AZAD, M. A. K.; SARKER, M.; LI, T.; YIN, J. Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. **Biomed Res Int**, v. 2018, n., p. 9478630, 2018.

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.

BANGASSER, D. A.; CUARENTA, A. Sex differences in anxiety and depression: circuits and mechanisms. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 22, n. 11, p. 674-684, 2021.

BARR, S. I. Perceived lactose intolerance in adult Canadians: a national survey. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 38, n. 8, p. 830-835, 2013.

BARRETT, E.; ROSS, R. P.; O'TOOLE, P. W.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. gamma-Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 2, p. 411-417, 2012.

BERCIK, P.; DENOU, E.; COLLINS, J.; JACKSON, W.; LU, J.; JURY, J.; DENG, Y.; BLENNERHASSETT, P.; MACRI, J.; MCCOY, K. D.; VERDU, E. F.; COLLINS, S. M. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotrophic factor and behavior in mice. **Gastroenterology**, v. 141, n. 2, p. 599-609, 609 e591-593, 2011.

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.

BOROWSKI, T. B.; KOKKINIDIS, L. Contribution of ventral tegmental area dopamine neurons to expression of conditional fear: effects of electrical stimulation, excitotoxin lesions, and quinpirole infusion on potentiated startle in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 110, n. 6, p. 1349-1364, 1996.

BRANISTE, V.; AL-ASMAKH, M.; KOWAL, C.; ANUAR, F.; ABBASPOUR, A.; TOTH, M.; KORECKA, A.; BAKOCEVIC, N.; NG, L. G.; KUNDU, P.; GULYAS, B.; HALLDIN, C.; HULTENBY, K.; NILSSON, H.; HEBERT, H.; VOLPE, B. T.; DIAMOND, B.; PETTERSSON, S. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. **Sci Transl Med**, v. 6, n. 263, p. 263ra158, 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.

CANTERAS, N. S.; RESSTEL, L. B.; BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ ADE, P.; GUIMARAES, F. S. Neuroanatomy of anxiety. **Curr Top Behav Neurosci**, v. 2, n., p. 77-96, 2010.

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.

CARDOSO, C. V.; DE BARROS, M. P.; BACHI, A. L. L.; BERNARDI, M. M.; KIRSTEN, T. B.; DE FATIMA MONTEIRO MARTINS, M.; ROCHA, P. R. D.; DA SILVA RODRIGUES, P.; BONDAN, E. F. Chemobrain in rats: Behavioral, morphological, oxidative and inflammatory effects of doxorubicin administration. **Behavioural Brain Research**, v. 378, n., p. 112233, 2020.

CENIT, M. C.; SANZ, Y.; CODONER-FRANCH, P. Influence of gut microbiota on neuropsychiatric disorders. **World J Gastroenterol**, v. 23, n. 30, p. 5486-5498, 2017.

CHENOLL, E.; CASINOS, B.; BATALLER, E.; ASTALS, P.; ECHEVARRIA, J.; IGLESIAS, J. R.; BALBARIE, P.; RAMON, D.; GENOVES, S. Novel probiotic *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 strain active against the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1335-1343, 2011.

CHOLERIS, E.; CLIPPERTON-ALLEN, A. E.; GRAY, D. G.; DIAZ-GONZALEZ, S.; WELSMAN, R. G. Differential effects of dopamine receptor D1-type and D2-type antagonists and phase of the estrous cycle on social learning of food preferences, feeding, and social interactions in mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 8, p. 1689-1702, 2011.

CHU, C.; MURDOCK, M. H.; JING, D.; WON, T. H.; CHUNG, H.; KRESSEL, A. M.; TSAAVA, T.; ADDORISIO, M. E.; PUTZEL, G. G.; ZHOU, L.; BESSMAN, N. J.; YANG, R.; MORIYAMA, S.; PARKHURST, C. N.; LI, A.; MEYER, H. C.; TENG, F.; CHAVAN, S. S.; TRACEY, K. J.; REGEV, A.; SCHROEDER, F. C.; LEE, F. S.; LISTON, C.; ARTIS, D. The microbiota regulate neuronal function and fear extinction learning. **Nature**, v. 574, n. 7779, p. 543-548, 2019.

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.

CORELLA, D.; ARREGUI, M.; COLTELL, O.; PORTOLES, O.; GUILLEM-SAIZ, P.; CARRASCO, P.; SORLI, J. V.; ORTEGA-AZORIN, C.; GONZALEZ, J. I.; ORDOVAS, J. M. Association of the LCT-13910C>T polymorphism with obesity and its modulation by dairy products in a Mediterranean population. **Obesity (Silver Spring)**, v. 19, n. 8, p. 1707-1714, 2011.

CRYAN, J. F.; O'RIORDAN, K. J.; COWAN, C. S. M.; SANDHU, K. V.; BASTIAANSEN, T. F. S.; BOEHME, M.; CODAGNONE, M. G.; CUSSOTTO, S.; FULLING, C.; GOLUBEVA, A. V.; GUZZETTA, K. E.; JAGGAR, M.; LONG-SMITH, C. M.; LYTE, J. M.; MARTIN, J. A.; MOLINERO-PEREZ, A.; MOLONEY, G.; MORELLI, E.; MORILLAS, E.; O'CONNOR, R.; CRUZ-PEREIRA, J. S.; PETERSON, V. L.; REA, K.; RITZ, N. L.; SHERWIN, E.; SPICHAK, S.; TEICHMAN, E. M.; VAN DE WOUW, M.; VENTURA-SILVA, A. P.; WALLACE-FITZSIMONS, S. E.; HYLAND, N.; CLARKE, G.; DINAN, T. G. The Microbiota-Gut-Brain Axis. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 4, p. 1877-2013, 2019.

DE LA MORA, M. P.; CARDENAS-CACHON, L.; VAZQUEZ-GARCIA, M.; CRESPO-RAMIREZ, M.; JACOBSEN, K.; HOISTAD, M.; AGNATI, L.; FUXE, K. Anxiolytic effects of intra-amygdaloid injection of the D1 antagonist SCH23390 in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 377, n. 2, p. 101-105, 2005.

DE LA MORA, M. P.; GALLEGOS-CARI, A.; ARIZMENDI-GARCIA, Y.; MARCELLINO, D.; FUXE, K. Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. **Prog Neurobiol**, v. 90, n. 2, p. 198-216, 2010.

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.

DI STEFANO, M.; MICELI, E.; MAZZOCCHI, S.; TANA, P.; MORONI, F.; CORAZZA, G. R. Visceral hypersensitivity and intolerance symptoms in lactose malabsorption.

Neurogastroenterol Motil, v. 19, n. 11, p. 887-895, 2007.

DINAN, T. G.; STANTON, C.; CRYAN, J. F. Psychobiotics: a novel class of psychotropic. **Biological Psychiatry**, v. 74, n. 10, p. 720-726, 2013.

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.

ENTER, D.; COLZATO, L. S.; ROELOFS, K. Dopamine transporter polymorphisms affect social approach-avoidance tendencies. **Genes Brain and Behavior**, v. 11, n. 6, p. 671-676, 2012.

ERNY, D.; HRABE DE ANGELIS, A. L.; JAITIN, D.; WIEGHOFER, P.; STASZEWSKI, O.; DAVID, E.; KEREN-SHAUL, H.; MAHLAKOIV, T.; JAKOBSHAGEN, K.; BUCH, T.; SCHWIERZECK, V.; UTERMÖHLEN, O.; CHUN, E.; GARRETT, W. S.; MCCOY, K. D.; DIEFENBACH, A.; STAEHEL, P.; STECHER, B.; AMIT, I.; PRINZ, M. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 965-977, 2015.

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.

FELIX-ORTIZ, A. C.; TYE, K. M. Amygdala inputs to the ventral hippocampus bidirectionally modulate social behavior. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 2, p. 586-595, 2014.

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.

FU, Y. R.; YI, Z. J.; PEI, J. L.; GUAN, S. Effects of Bifidobacterium bifidum on adaptive immune senescence in aging mice. **Microbiology and Immunology**, v. 54, n. 10, p. 578-583, 2010.

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.

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.

GOH, L. H.; MOHD SAID, R.; GOH, K. L. Lactase deficiency and lactose intolerance in a multiracial Asian population in Malaysia. **JGH Open**, v. 2, n. 6, p. 307-310, 2018.

GOKDEMIR, O.; CETINKAYA, C.; GUMUS, H.; AKSU, I.; KIRAY, M.; ATES, M.; KIRAY, A.; BAYKARA, B.; BAYKARA, B.; SISMAN, A. R.; UYSAL, N. The effect of exercise on anxiety- and depression-like behavior of aged rats. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 95, n. 1, p. 8-17, 2020.

GUARRACI, F. A.; FROHARDT, R. J.; KAPP, B. S. Amygdaloid D1 dopamine receptor involvement in Pavlovian fear conditioning. **Brain Research**, v. 827, n. 1-2, p. 28-40, 1999.

GUARRACI, F. A.; FROHARDT, R. J.; YOUNG, S. L.; KAPP, B. S. A functional role for dopamine transmission in the amygdala during conditioned fear. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 877, n., p. 732-736, 1999.

GUARRACI, F. A.; FROHARDT, R. J.; FALLS, W. A.; KAPP, B. S. The effects of intra-amygdaloid infusions of a D2 dopamine receptor antagonist on Pavlovian fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v. 114, n. 3, p. 647-651, 2000.

GUGLIELMETTI, S.; MORA, D.; GSCHWENDER, M.; POPP, K. Randomised clinical trial: Bifidobacterium bifidum MIMBb75 significantly alleviates irritable bowel syndrome and improves quality of life--a double-blind, placebo-controlled study. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 33, n. 10, p. 1123-1132, 2011.

GUNAYDIN, L. A.; DEISSEROTH, K. Dopaminergic Dynamics Contributing to Social Behavior. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 79, n., p. 221-227, 2014.

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.

HEIANZA, Y.; SUN, D.; MA, W.; ZHENG, Y.; CHAMPAGNE, C. M.; BRAY, G. A.; SACKS, F. M.; QI, L. Gut-microbiome-related LCT genotype and 2-year changes in body composition and fat distribution: the POUNDS Lost Trial. **Int J Obes (Lond)**, v. 42, n. 9, p. 1565-1573, 2018.

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.

HORVATH, A.; DZIECHCIARZ, P.; SZAJEWSKA, H. Meta-analysis: Lactobacillus rhamnosus GG for abdominal pain-related functional gastrointestinal disorders in childhood. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 33, n. 12, p. 1302-1310, 2011.

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.

KHAILOVA, L.; MOUNT PATRICK, S. K.; ARGANBRIGHT, K. M.; HALPERN, M. D.; KINOUCI, T.; DVORAK, B. Bifidobacterium bifidum reduces apoptosis in the intestinal epithelium in necrotizing enterocolitis. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 299, n. 5, p. G1118-1127, 2010.

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.

LAMONT, E. W.; KOKKINIDIS, L. Infusion of the dopamine D1 receptor antagonist SCH 23390 into the amygdala blocks fear expression in a potentiated startle paradigm. **Brain Research**, v. 795, n. 1-2, p. 128-136, 1998.

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.

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.

LENOIR, M.; DEL CARMEN, S.; CORTES-PEREZ, N. G.; LOZANO-OJALVO, D.; MUNOZ-PROVENCIO, D.; CHAIN, F.; LANGELLA, P.; DE MORENO DE LEBLANC, A.; LEBLANC, J. G.; BERMUDEZ-HUMARAN, L. G. Lactobacillus casei BL23 regulates Treg and Th17 T-cell populations and reduces DMH-associated colorectal cancer. **Journal of Gastroenterology**, v. 51, n. 9, p. 862-873, 2016.

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.

LOMER, M. C.; PARKES, G. C.; SANDERSON, J. D. Review article: lactose intolerance in clinical practice--myths and realities. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 27, n. 2, p. 93-103, 2008.

MANCO, L.; DIAS, H.; MUC, M.; PADEZ, C. The lactase -13910C>T polymorphism (rs4988235) is associated with overweight/obesity and obesity-related variables in a population sample of Portuguese young adults. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 1, p. 21-24, 2017.

MANDUCA, A.; SERVADIO, M.; DAMSTEEGT, R.; CAMPOLONGO, P.; VANDERSCHUREN, L. J.; TREZZA, V. Dopaminergic Neurotransmission in the Nucleus Accumbens Modulates Social Play Behavior in Rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 9, p. 2215-2223, 2016.

MARGOLIS, K. G.; CRYAN, J. F.; MAYER, E. A. The Microbiota-Gut-Brain Axis: From Motility to Mood. **Gastroenterology**, v. 160, n. 5, p. 1486-1501, 2021.

MAYER, E. A.; LABUS, J.; AZIZ, Q.; TRACEY, I.; KILPATRICK, L.; ELSENBRUCH, S.; SCHWEINHARDT, P.; VAN OUDENHOVE, L.; BORSOOK, D. Role of brain imaging in disorders of brain-gut interaction: a Rome Working Team Report. **Gut**, v. 68, n. 9, p. 1701-1715, 2019.

MCHENRY, J.; CARRIER, N.; HULL, E.; KABBAJ, M. Sex differences in anxiety and depression: role of testosterone. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 1, p. 42-57, 2014.

MORAES, M. M.; GALVAO, M. C.; CABRAL, D.; COELHO, C. P.; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N.; MARTINS, M. F.; BONDAN, E. F.; BERNARDI, M. M.; KIRSTEN, T. B. Propentofylline Prevents Sickness Behavior and Depressive-Like Behavior

Induced by Lipopolysaccharide in Rats via Neuroinflammatory Pathway. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0169446, 2017.

MOSCA, F.; GIANNI, M. L. Human milk: composition and health benefits. **Pediatr Med Chir**, v. 39, n. 2, p. 155, 2017.

NADER, K.; LEDOUX, J. E. Inhibition of the mesoamygdala dopaminergic pathway impairs the retrieval of conditioned fear associations. **Behavioral Neuroscience**, v. 113, n. 5, p. 891-901, 1999.

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.

PARISI, D. P.; SANTOS, S. A. R.; CABRAL, D.; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N.; FLORIO, J. C.; BERNARDI, M. M.; KIRSTEN, T. B. Therapeutical doses of ivermectin and its association with stress disrupt motor and social behaviors of juvenile rats and serotonergic and dopaminergic systems. **Research in Veterinary Science**, v. 124, n., p. 149-157, 2019.

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.

PEIRCE, J. M.; ALVINA, K. The role of inflammation and the gut microbiome in depression and anxiety. **Journal of Neuroscience Research**, v. 97, n. 10, p. 1223-1241, 2019.

PEREZ DE LA MORA, M.; JACOBSEN, K. X.; CRESPO-RAMIREZ, M.; FLORES-GRACIA, C.; FUXE, K. Wiring and volume transmission in rat amygdala. Implications for fear and anxiety. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 8, p. 1618-1633, 2008.

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.

POST, M. R.; SULZER, D. The chemical tools for imaging dopamine release. **Cell Chem Biol**, v. 28, n. 6, p. 748-764, 2021.

PUGLISI-ALLEGRA, S.; CABIB, S. Psychopharmacology of dopamine: the contribution of comparative studies in inbred strains of mice. **Prog Neurobiol**, v. 51, n. 6, p. 637-661, 1997.

ROBINSON, D. L.; HEIEN, M. L.; WIGHTMAN, R. M. Frequency of dopamine concentration transients increases in dorsal and ventral striatum of male rats during introduction of conspecifics. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 23, p. 10477-10486, 2002.

ROCHA, T. V.; SILVA, V. S. A.; KIRSTEN, T. B. Estabelecimento de modelo experimental de intolerância à lactose em ratos. In: XXIV Encontro de Iniciação Científica e Tecnológica UNIP/SANTANDER, 2022, São Paulo:Universidade Paulista, Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, p. e.

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

SCHROEDER, B. O.; BACKHED, F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. **Natural Medicines**, v. 22, n. 10, p. 1079-1089, 2016.

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.

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

SIMIONESCU, G.; ILIE, O. D.; CIOBICA, A.; DOROFTEI, B.; MAFTEI, R.; GRAB, D.; MCKENNA, J.; DHUNNA, N.; MAVROUDIS, I.; ANTON, E. Mini-Review on the Possible Interconnections between the Gut-Brain Axis and the Infertility-Related Neuropsychiatric

Comorbidities. **Brain Sci**, v. 10, n. 6, p., 2020.

SNARSKA, J.; FIEDOROWICZ, E.; ROZMUS, D.; WRONSKI, K.; LATACZ, M.; KORDULEWSKA, N.; PLOMINSKI, J.; GRZYBOWSKI, R.; SAVELKOUL, 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.

SU, G. L.; KO, C. W.; BERCIK, P.; FALCK-YTTER, Y.; SULTAN, S.; WEIZMAN, A. V.; MORGAN, R. L. AGA Clinical Practice Guidelines on the Role of Probiotics in the Management of Gastrointestinal Disorders. **Gastroenterology**, v. 159, n. 2, p. 697-705, 2020.

TILLISCH, K.; MAYER, E. A.; LABUS, J. S. Quantitative meta-analysis identifies brain regions activated during rectal distension in irritable bowel syndrome. **Gastroenterology**, v. 140, n. 1, p. 91-100, 2011.

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

WANG, L.; HAN, D.; YIN, P.; TENG, K.; XU, J.; MA, Y. Decreased tryptophan hydroxylase 2 mRNA and protein expression, decreased brain serotonin concentrations, and anxiety-like behavioral changes in a rat model of simulated transport stress. **Stress**, v. 22, n. 6, p. 707-717, 2019.

WATT, M. J.; ROBERTS, C. L.; SCHOLL, J. L.; MEYER, D. L.; MILLER, L. C.; BARR, J. L.; NOVICK, A. M.; RENNER, K. J.; FORSTER, G. L. Decreased prefrontal cortex dopamine activity following adolescent social defeat in male rats: role of dopamine D2 receptors. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 231, n. 8, p. 1627-1636, 2014.

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

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.

ZARRINDAST, M. R.; KHAKPAI, F. The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior. **Arch Iran Med**, v. 18, n. 9, p. 591-603, 2015.

ANEXOS

Anexo 1 – Certificado de aprovação do Projeto junto a CEUA/UNIP



Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo de modelo experimental de intolerância à lactose em ratos: relação com distúrbios psiquiátricos", protocolada sob o CEUA nº 3308170621 (ID 000666), sob a responsabilidade de **Thiago Berti Kirsten e equipe; 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 22/07/2021.

We certify that the proposal "Study of experimental models of lactose intolerance in rats: relationship with psychiatric disorders", utilizing 48 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 3308170621 (ID 000666), under the responsibility of **Thiago Berti Kirsten and team; 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 07/22/2021.

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

Vigência da Proposta: de [09/2021](#) a [09/2024](#)

Área: [Patologia Ambiental E Experimental](#)

Origem: [Biotério de Experimentação](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [60 a 120 dias](#)

N: [48](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [180 a 350 g](#)

Local do experimento: Biotério e Laboratórios de Experimentação da Universidade Paulista (Centro de Pesquisa, São Paulo, SP).

São Paulo, 19 de agosto de 2021

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

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