



Avaliação da transferência placentária de neomicina, ampicilina e sua combinação quando administrados durante a gestação. Validação do modelo de disbiose gestacional

Palavras-Chave: Microbiota intestinal, Disbiose gestacional, Antibiótico

Autores(as):

Manuela Dainez Aquotti, FCF - UNICAMP

Ana Paula Sanches, FCA - UNICAMP

Juliana Mozer Sciani, USF

Malu Benedetti Nascimento, FCF - UNICAMP

Georgia Correa Atella, UFRJ

Mileane de Souza Busch, UFRJ

Gabriel da Silva Cordeiro, IB - UNICAMP

Kênia Moreno de Oliveira, IB - UNICAMP

Letícia Ignacio-Souza Zimmermann, FCA - UNICAMP

Dr^a Valquiria Aparecida Matheus (coorientadora), FCF - UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Catarina Raposo Dias Carneiro (orientadora), FCF - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A microbiota intestinal é composta por diversos microrganismos, como vírus, fungos e, predominantemente, bactérias, que metabolizam fibras não digeridas pelo hospedeiro em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). A composição dessa microbiota exerce influência direta sobre a simbiose com o hospedeiro (Spiljar et al., 2017) e, quando há desequilíbrios em sua diversidade ou abundância, condição conhecida como disbiose, observa-se maior susceptibilidade a doenças como obesidade e outras alterações metabólicas (Ley et al., 2006; Birkeland et al., 2023).

Modelos murinos têm sido amplamente utilizados para o estudo da disbiose, sendo os animais germ-free (isentos de microbiota) considerados altamente eficientes para esse fim (Janssen et al., 2015). No entanto, a manutenção desses modelos é complexa e onerosa. Como alternativa, a literatura reconhece a indução da disbiose por meio da administração de um mix de antibióticos como uma estratégia viável e acessível (Mukhopadhyay et al., 2023).

Estudos sobre disbiose materna já demonstraram impactos significativos na saúde da prole (Liu et al., 2021). Contudo, o uso de antibióticos para a depleção da microbiota durante a gestação ainda gera controvérsias, principalmente devido à possibilidade de passagem dos fármacos pela barreira

placentária. Embora estudos em humanos tenham identificado a presença de ampicilina na circulação fetal após administração intravenosa em altas doses (Berardi et al., 2018), ainda não há evidências sobre os efeitos do uso desse antibiótico em baixas doses administradas por via oral, como proposto neste modelo experimental de disbiose.

Diante desse cenário, o objetivo deste projeto é validar o uso combinado de ampicilina e neomicina para indução de disbiose gestacional em modelo murino e investigar se os efeitos observados na prole decorrem de uma possível transferência placentária dos antibióticos ou das alterações na disponibilidade de AGCCs provocadas pela disbiose materna.

METODOLOGIA:

Camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6J foram acasalados, e as fêmeas com presença de rolha vaginal foram separadas individualmente para início da intervenção. A partir desse momento, as fêmeas prenhes (n = 5 por grupo) receberam antibióticos diluídos na água de beber, conforme os seguintes grupos experimentais: Grupo AMP (1 mg/mL de ampicilina), Grupo NEO (0,5 mg/mL de neomicina), Grupo ABX (combinação das duas concentrações anteriores) e Grupo CT (controle sem antibiótico). A eutanásia foi realizada no 15º dia de gestação para coleta de fetos, placentas e líquido amniótico.

Os fetos foram pesados e medidos, e as placentas avaliadas quanto ao peso e ao Índice de Eficiência Placentária (peso fetal/peso placentário), além do número de reabsorções por gestação. As placentas foram fixadas em paraformaldeído a 4% e submetidas à rotina histológica padrão, incluindo inclusão em Paraplast®, microtomia a 5 µm e coloração em hematoxilina-eosina para análise histológica.

Para análise molecular, o mRNA foi extraído das placentas e convertido em cDNA, seguido de qPCR para expressão de TGF-β, ocludina e VE-caderina. A presença de antibióticos no líquido amniótico foi avaliada por HPLC-MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas).

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.0. Para comparação entre os grupos, foi utilizado o teste One-Way ANOVA para dados paramétricos e o teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos, considerando diferenças estatisticamente significativas para $p < 0,05$. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética (CEUA nº 6278-1/2023).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Em análise por HPLC-MS do líquido amniótico, os grupos que receberam a intervenção (AMP, NEO e ABX) não apresentaram picos compatíveis com os controles positivos, o que sugere que nenhum dos antibióticos ultrapassou a barreira placentária. Dessa forma, é possível inferir que as alterações observadas na prole não decorrem da ação direta desses fármacos. A passagem para a circulação fetal depende da dose e da via de administração (Nau, 1987), o que justifica o fato de que, embora estudos

com ampicilina intravenosa em altas doses tenham demonstrado transferência placentária (Berardi et al., 2018), a administração oral em baixa dose, como utilizada neste modelo, não resulta no mesmo efeito.

Quanto aos fenótipos analisados, observou-se que o número de fetos por prenhez foi reduzido no grupo ABX em comparação ao controle (CT). Foram identificadas duas reabsorções no grupo NEO e três no grupo ABX; embora esses valores não tenham atingido significância estatística, sugerem que a menor quantidade de fetos no grupo ABX possa estar relacionada a perdas gestacionais. O peso placentário foi significativamente maior no grupo NEO em relação ao controle, enquanto o Índice de Eficiência Placentária (IEP) foi reduzido no grupo AMP. Além disso, os fetos do grupo NEO apresentaram maior comprimento e peso em comparação aos do grupo AMP. Considerando-se a ausência de antibióticos no líquido amniótico, os efeitos identificados na prole e nas placentas são atribuídos, com alta probabilidade, às alterações induzidas pela disbiose materna, o que reforça a eficácia do modelo experimental proposto.

As análises histopatológicas das placentas evidenciaram redução da área da zona do labirinto no grupo ABX, região responsável pela troca de nutrientes e gases entre as circulações materna e fetal. Essa alteração pode indicar comprometimento funcional da placenta, com possíveis repercussões no desenvolvimento fetal.

Em relação aos resultados obtidos por qPCR, a expressão de VE-caderina não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Ainda assim, essa molécula atua na manutenção da integridade do endotélio placentário, e estudos anteriores já relacionaram sua expressão reduzida a alterações morfológicas da zona do labirinto (Chang et al., 2005; Sung et al., 2022). A expressão de TGF- β foi reduzida no grupo ABX, sugerindo efeitos negativos da disbiose gestacional sobre o desenvolvimento embrionário (Wen et al., 2023). Por outro lado, a expressão de ocludina foi aumentada no grupo NEO, proteína envolvida na manutenção da integridade e permeabilidade da barreira placentária. Esse achado contraria a expectativa de redução da integridade tecidual em contextos de disbiose (Stolfi et al., 2022), o que levanta a hipótese de um mecanismo compensatório local. Para melhor compreensão desse resultado, seria pertinente avaliar também a expressão de claudinas na placenta, considerando que suas funções frequentemente se inter-relacionam (Feldman et al., 2005; Morrow et al., 2010).

CONCLUSÕES:

O modelo experimental proposto, baseado na administração oral de ampicilina e neomicina para indução de disbiose gestacional em camundongos, demonstrou-se eficaz, uma vez que não foi detectada transferência placentária dos antibióticos para o líquido amniótico. Assim, as alterações observadas na prole podem ser atribuídas, de forma consistente, às modificações na microbiota materna.

Foram identificadas alterações fenotípicas nos fetos e nas placentas, com efeitos distintos entre os grupos experimentais, incluindo alterações no número de fetos, peso placentário, índice de eficiência

placentária e desenvolvimento fetal. Além disso, a análise histológica revelou redução da zona do labirinto nas placentas do grupo ABX, região essencial para a troca de nutrientes entre mãe e feto. No nível molecular, a disbiose gestacional promoveu redução na expressão de TGF- β no grupo ABX e aumento na expressão de ocludina no grupo NEO. Embora a expressão de VE-caderina não tenha apresentado diferenças estatísticas, os dados indicam tendência de redução no grupo ABX, o que pode ter implicações funcionais na estrutura da placenta.

Esses achados indicam que a disbiose gestacional pode modular a expressão gênica e afetar o desenvolvimento placentário e fetal, mesmo na ausência de exposição direta aos antibióticos. O modelo proposto, portanto, representa uma ferramenta válida e confiável para estudos futuros sobre os efeitos da disbiose durante a gestação, incluindo abordagens dentro do eixo microbiota-placenta-feto.

BIBLIOGRAFIA

- BERARDI, Alberto; *et al.* **Are postnatal ampicillin levels actually related to the duration of intrapartum antibiotic prophylaxis prior to delivery? A pharmacokinetic study in 120 neonates.** Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 103, F152-F156, 2018
- BIRKELAND, Eline; *et al.* **Short-chain fatty acids as a link between diet and cardiometabolic risk: a narrative review.** Lipids Health Dis, 22, n.40, 2023
- CHANG, Chih-Ching; *et al.* **Induction of VE-cadherin in rat placental trophoblasts by VEGF through a NO-dependent pathway.** Placenta, 26, p.234-241, 2005
- FELDMAN, Gemma J.; *et al.* **Occludin: Structure, function and regulation.** Advanced Drug Delivery Reviews, v.57, p.883-917, 2005
- JANSSEN, Aafke W. F.; *et al.* **The role of the gut microbiota in metabolic health.** FASEB Journal, 29, p.3111-3123, 2015
- LEY, Ruth E.; *et al.* **Human gut microbes associated with obesity.** Nature, 444, p.1022-1023
- LIU, Xiaoning; *et al.* **High-fiber diet mitigates maternal obesity-induced cognitive and social dysfunction in the offspring via gut-brain axis.** Cell Metab, 33, p.923-938, e6, 2021
- MORROW, Carla M. K.; *et al.* **Claudin and occludin expression and function in the seminiferous epithelium.** Philosophical Transactions of the Royal Society B, v.365, p.1679-1696, 2010
- MUKHOPADHYAY, Sohini; *et al.* **A comparative analysis of gut microbial dysbiosis by select antibiotics and DSS to understand the effects of perturbation on the host immunity and metabolism.** Life Sci, 312, 2023
- NAU, Heins. **Clinical pharmacokinetics in pregnancy and perinatology.** Dev Pharmacol Ther, 10, p.174-198, 1987
- SPIIJAR, Martina; *et al.* **The immune system bridges the gut microbiota with systemic energy homeostasis: Focus on TLRs, mucosal barrier, and SCFAs.** Front Immunol, 8, 2017
- STOLFI, Carmine; *et al.* **Implication of Intestinal Barrier Dysfunction in Gut Dysbiosis and Diseases.** Biomedicines, 10, 289, 2022

SUNG, Derek C.; *et al.* **VE-cadherin enables trophoblast endovascular invasion and spiral artery Remodeling during placental development** ELife, 11, e77241, 2022

WEN, Baohong; *et al.* **The Role of TGF- β during Pregnancy and Pregnancy Complications.** Int J Mol Sci, 24, 16882, 2023