UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ALESSANDRA OLIVEIRA SILVA

AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIOXIDANTE DA MINOCICLINA *IN VITRO* E DE SEUS EFEITOS NA DISBIOSE, NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E CARDÍACAS CAUSADAS POR DIETA RICA EM CARBOIDRATOS REFINADOS EM CAMUNDONGOS.

ALFENAS/MG

2024

ALESSANDRA OLIVEIRA SILVA

AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIOXIDANTE DA MINOCICLINA *IN VITRO* E DE SEUS EFEITOS NA DISBIOSE, E NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E CARDÍACAS CAUSADAS POR DIETA RICA EM CARBOIDRATOS REFINADOS EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas. Linha de pesquisa: Bioquímica e Farmacologia Aplicadas às Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profª. Drª. Carla Speroni Ceron.

Coorientador: Prof. Dr. Stêfany Bruno de Assis Cau e Prof. Dr. Daniel Granato.

ALFENAS/MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Biblioteca Central.

Silva, Alessandra Oliveira.
Avaliação do perfil antioxidante da minociclina in vitro e de seus efeitos na disbiose, nas alterações comportamentais e cardíacas causadas por dietarica em carboidratos refinados em camundongos. / Alessandra Oliveira Silva.
- Alfenas, MG, 2024.
98 f. : il. -

Orientador(a): Carla Speroni Ceron.
Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal deAlfenas, Alfenas, MG, 2024.
Bibliografia.

1. Minociclina. 2. Estresse oxidativo. 3. Dieta. 4. MMPs. 5. Doenças cardiovasculares. I. Ceron, Carla Speroni , orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

ALESSANDRA OLIVEIRA SILVA

"AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIOXIDANTE DA MINOCICLINA IN VITRO E DE SEUS EFEITOS NA DISBIOSE, NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E CARDÍACAS CAUSADAS POR DIETA RICA EM CARBOIDRATOS REFINADOS EM CAMUNDONGOS"

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 01 de agosto de 2024.

Profa. Dra. Carla Speroni Ceron
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli
Instituição: Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Lisandra Brandino de Oliveira
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Larissa Helena Lobo Torres Pacheco
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Documento assinado eletronicamente por **Carla Speroni Ceron**, **Usuário Externo**, em 15/08/2024, às 19:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1316547** e o código CRC **3A6F4EA9**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me fortalecer ao longo dessa caminhada e me direcionar a cada dia

Ao meus pais, João e Lucineia, por me apoiarem sempre e me amarem incondicionalmente.

À minha irmã, Débora, por estar sempre presente em cada passo da minha vida, por sempre me apoiar e cuidar de mim.

À minha orientadora Prof. Dr. Carla Speroni Ceron que me ensinou o que é ser uma pesquisadora e a amar cada dia mais a pesquisa. Por ser meu suporte e por toda confiança depositada ao longo dessa caminhada. Você é muito mais que uma orientada, obrigada por ser quem é na minha vida.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Stêfany Bruno de Assis Cau por cada ensinamento, por acreditar em mim e por abrir as portas da UFMG para esse projeto.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Daniel Granato que nos permitiu ampliar esse projeto, nos recebendo em seu laboratório na Universidade de Limerick na Irlanda. Obrigada pela confiança, por me ensinar e me permitir enxergar um mundo novo dentro da pesquisa.

À Prof. Dra. Luciana Azevedo por ter confiado em mim, permitindo participar de um projeto tão relevante. Obrigada por me dar essa oportunidade enriquecedora, que me amadureceu de diferentes formas.

À Prof. Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula e Prof. Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão por toda colaboração.

Aos técnicos Matheus e Luis Felipe, á querida Patrícia e ao Prof. Dr. Marcos José pela colaboração nos ensaios de histologia.

À Prof. Dra. Larissa Helena Torres por toda ajuda e por estar sempre pronta a auxiliar em cada etapa desse projeto.

À Prof. Dra. Marcia Helena Cardoso por ter despertado o meu amor pela farmacologia, você é uma referência para mim.

À Karla e Nícia, sem vocês a parte experimental desse projeto não seria possível. Obrigada por ser meu suporte em BH.

Os meus colegas do LAFEC por estarem comigo todos os dias me permitindo aprender sempre mais, auxiliando e dando suporte para que tudo isso fosse realizado. E pelas boas risadas entre um café e outro.

Aos meus queridos amigos, especialmente aqueles que estiveram comigo de perto em todos os momentos desse doutorado, me dando suporte e tornando os dias mais fáceis.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fabi, obrigada por todo apoio e por ser essa profissional incrível e acolher cada aluno de forma única.

À Universidade Federal de Alfenas, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por me proporcionar as ferramentas necessárias para que essa etapa fosse concluída.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro para a realização da pesquisa.

E a todos aqueles que aqui não foram mencionados, mas que de alguma forma contribuíram para que este projeto fosse concretizado, meu muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Grandes coisas fez o Senhor por nós, e por isso estamos alegres”.

(Salmos 126:3)

RESUMO

Os alimentos à base de açúcares estão relacionados a danos cardíacos e do sistema nervoso central, em decorrência do aumento do estresse oxidativo, alteração da microbiota e maior ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. O cloridrato de minociclina é um antibiótico que possui propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e inibe as metaloproteinases (MMPs). Diante disso, objetivamos *in vitro* avaliar o perfil antioxidante da minociclina, e de seus efeitos na disbiose, nas alterações comportamentais e cardíacas em camundongos submetidos a dieta rica em carboidratos refinados (HC). Para os testes *in vitro*, comparou-se a minociclina na sua forma bruta e digerida em relação a sua atividade antioxidante e proteção contra a oxidação, em eritrócitos e plasma humano. Para os testes *in vivo*, camundongos Balb/C foram tratados com dieta padrão e dieta HC por 12 semanas, recebendo por gavagem, água ou minociclina (50 mg/kg) da 10° a 12° semana. Monitorou-se o peso corporal e o consumo de ração, ainda, no final do protocolo, realizou-se a coleta de fezes para avaliação da microbiota e o teste comportamental de labirinto em cruz elevado (LEC). Após eutanásia, o tecido adiposo branco, sangue e coração foram coletados para as seguintes análises: índice de adiposidade, análises bioquímicas e avaliação de marcadores de estresse oxidativo. Observou-se que o processo de digestão aumentou a atividade antioxidante da minociclina nos testes químicos *in vitro* e protegeu os eritrócitos e o plasma contra os danos oxidativos. Em relação as análises *in vivo*, os animais apresentaram no LEC aumento de *grooming*, diminuição do *head dipping* e da permanência nos braços abertos. Ainda, há alteração da microbiota com aumento de *Firmicutes* e diminuição de *Bacteroidetes*. Esses dados indicam o desenvolvimento do comportamento do tipo ansioso, sendo que a minociclina reverteu parcialmente esses danos. Adicionalmente, observou-se aumento no consumo de ração apenas no início do experimento, tornando insignificativo após a 4° semana. O peso corporal não foi alterado, no entanto, houve um aumento do índice de adiposidade com alteração do perfil lipídico nos animais que passaram pela dieta HC, acompanhando de aumento na atividade da creatinina quinase fração MB,

indicando um dano no miocárdio. Nesse sentindo, percebe-se um aumento do estresse oxidativo cardíaco causado pela dieta, com diminuição de glutationa, aumento de espécies reativas de oxigênio, culminando no aumento da atividade das MMPs e consequente aumento do depósito de colágeno intersticial. Além disso, houve aumento na atividade da catalase e da glutationa peroxidase. A minociclina apresentou uma boa atividade antioxidante *in vitro*, principalmente na sua forma digerida. Os animais tratados com minociclina obtiveram melhora do perfil lipídico, estresse oxidativo e diminuição da porcentagem de colágeno, sugerindo que esse composto possa reduzir os danos causados por uma dieta HC, atuando contra o remodelamento tecidual.

Palavras-chave: minociclina; estresse oxidativo; dieta; MMPs; doenças cardiovasculares.

ABSTRACT

Sugar-based foods are associated with cardiac and central nervous system damage due to increased oxidative stress, altered microbiota, and increased activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Minocycline hydrochloride is an antibiotic that has anti-inflammatory and antioxidant properties and inhibits metalloproteinases (MMPs). Therefore, we aimed to evaluate the antioxidant profile of minocycline in vitro and its effects on dysbiosis, behavioral, and cardiac changes in mice fed a diet rich in refined carbohydrates (HC). For the in vitro tests, minocycline in its raw and digested form was compared in relation to its antioxidant activity and protection against oxidation in human erythrocytes and plasma. For in vivo tests, Balb/C mice were treated with a standard diet and HC diet for 12 weeks, receiving water or minocycline (50 mg/kg) by gavage from the 10th to the 12th week. Body weight and food consumption were monitored, and at the end of the protocol, feces were collected to evaluate the microbiota and the elevated plus maze (EPM) behavioral test. After euthanasia, white adipose tissue, blood and heart were collected for the following analyses: adiposity index, biochemical analyses and evaluation of oxidative stress markers. It was observed that the digestion process increased the antioxidant activity of minocycline in in vitro chemical tests and protected erythrocytes and plasma against oxidative damage. Regarding the in vivo analyses, the animals showed increased grooming, decreased head dipping and time spent in the open arms in the EPM. Furthermore, there was a change in the microbiota with an increase in Firmicutes and a decrease in Bacteroidetes. These data indicate the development of anxiety-like behavior, and minocycline partially reversed this damage. Additionally, an increase in feed consumption was observed only at the beginning of the experiment, becoming insignificant after the 4th week. Body weight was not altered; however, there was an increase in the adiposity index with changes in the lipid profile in animals fed the HC diet, accompanied by an increase in the activity of creatine kinase MB fraction, indicating damage to the myocardium. In this sense, an increase in cardiac oxidative stress caused by the diet was observed, with a decrease in glutathione, an increase in reactive oxygen species, culminating in an increase in the activity of MMPs and a consequent increase in

the deposition of interstitial collagen. In addition, there was an increase in the activity of catalase and glutathione peroxidase. Minocycline showed good antioxidant activity in vitro, mainly in its digested form. Animals treated with minocycline showed improvements in their lipid profile, oxidative stress and a decrease in the percentage of collagen, suggesting that this compound can reduce the damage caused by a HC diet, acting against tissue remodeling.

Keywords: minocycline; oxidative stress; diet; MMPs; cardiovascular diseases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Estrutura geral das gelatinases MMP-2 e MMP-9. 22

Figura 2 – Ativação das metaloproteinases de matriz-2 22

Figura 3 – Produção de ERO e defesa antioxidante enzimática..... 26

Figura 4– Esquema geral do estudo 30

Figura 5– Minociclina bruta e digerida. 33

Figura 6 – Desenho experimental.... 38

Figura 7 – Proteção dos eritrócitos contra a oxidação 50

Figura 8 – Atividade das enzimas antioxidantes *in vitro*. 51

Figura 9 – Proteção contra a oxidação plasmática 52

Figura 10 - Evolução ponderal e efeitos da minociclina sob o peso (em gramas).... 53

Figura 11 – Consumo de ração diário e sobre a influência da administração de água ou minociclina (em gramas). 54

Figura 12 – Índice de adiposidade (%) 55

Figura 13 – Avaliação comportamental e níveis de corticosterona 56

Figura 14 – qPCR dos filos bacterianos da microbiota fecal.....57

Figura 15 – Determinação de parâmetros bioquímicos. 58

Figura 16 – Atividade da SOD.....59

Figura 17 – Atividade da catalase 60

Figura 18 – Atividade da GPx 60

Figura 19 – Níveis de GSH 61

Figura 20 – Níveis de TBARS 62

Figura 21 – Determinação de ERO*in situ* 63

Figura 22– Determinação de O_2^- e H_2O_2 64

Figura 23 – Níveis de MMP-2 por zimografia 65

Figura 24 – Níveis de MMP-9 por zimografia. 66

Figura 25 – Atividade gelatinolítica *in situ* 67

Figura 26 – Infiltrado inflamatório 68

Figura 27 – Porcentagem de colágeno 69

Figura 28– Conclusões do estudo. 81

LISTA DE TABELAS

Tabela1 – Sequência dos primers dos filos bacterianos para análises de qPCR 41

Tabela 2 – Atividade antioxidante da minociclina bruta e digerida.....49

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAPH	dicloridrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)
ACC	Acetil-CoA carboxilase
ChREBP	Proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidratos
CK-MB	Creatinina Quinase fração MB
DDPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DFCH-DA	diacetato de 2',7'- diclorofluoresceína
DHE	Sonda dihidroetídeo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E.P.M.	Erro padrão da média
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FIOP's	Produtos de oxidação fluorescente
GPx	Glutationa peroxidase
GSSG	Glutationa dissulfeto
GSH	Glutationa
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HC	Dieta rica em carboidratos refinados
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LCE	Labirinto em cruz elevado
LPL	Lipoproteína lipase
MMPs	Metaloproteinases
MMP-2	Metaloproteinase-2
MMP-9	Metaloproteinase-9
MDA	Malonaldeído
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NOX	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
ORAC	Capacidade de absorção de radicais de oxigênio

$O_2^{\cdot -}$	Ânions superóxido
$^{\cdot}OH$	Radical hidroxila
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PPARγ	Receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
SREBP-1	Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol-1
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de necrose tumoral -α
TBA	Ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....18
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....20
2.1 DANOS AO SISTEMA CARDIOVASCULAR ASSOCIADOS A DIETA HC.....20
2.2 DANOS AO SNC E NA MICROBIOTA ASSOCIADOS A DEITAS RICAS EM CARBOIDRATOS.....23
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO E ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES....24
2.4 MINOCICLINA.....27
3 OBJETIVOS.....31
3.1 OBJETIVO GERAL.....31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....31
4 MATERIAS E MÉTODOS.....32
4.1 ENSAIOS *IN VITRO*.....32
4.1.1 Digestão.....32
4.1.2 Atividade antioxidante da mincociclina digerida e não digerida ...33
4.1.3 Proteção dos eritrócitos humanos contra a oxidação.....34
4.1.4 Proteção contra a oxidação plasmática 36
4.2 ENSAIOS *IN VIVO* 37
4.2.1 Protocolo experimental.....37
4.2.2 Índice de adiposidade.....38
4.2.3 Avaliação comportamental.....39
4.2.4 Dosagem de corticosterona e determinação dos parâmetros bioquímicos.....39
4.2.5 Extração de DNA fecal 40
4.2.6 Atividade da SOD 41
4.2.7 Atividade da catalase.....42
4.2.8 Atividade da GPx..... 42
4.2.9 Níveis de GSH.....43
4.2.10 Determinação dos níveis de TBARS 43
4.2.11 Determinação de EROs *in situ* 44
4.2.12 Determinação de Determinação de O^{2-} 44
4.2.13 Determinação de Determinação de H_2O_2 44

4.2.14 Zimografia em gel....45
4.2.15 Zimografia *in situ* 46
4.2.16 Histologia....47
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA 47
5 RESULTADOS....49
5.1 ENSAIOS *IN VITRO*....49
5.1.1 Atividade antioxidante 49
5.1.2 Proteção dos eritrócitos contra a oxidação 49
5.1.3 Perfil das enzimas antioxidantes 50
5.1.2 Proteção contra a oxidação plasmática 51
5.2 ENSAIOS *IN VIVO* 52
5.2.1 Evolução ponderal 52
5.2.2 Consumo de ração....53
5.2.3 Índice de adiposidade....54
5.2.4 Avaliação comportamental e níveis de corticosterona 55
5.2.5 qPCR dos filos bacterianos da microbiota fecal....56
5.2.6 Determinação de parâmetros bioquímicos 57
5.2.7 Atividade da SOD, catalase e GPx 58
5.2.8 Níveis de GSH....61
5.2.9 Determinação dos níveis de TBARS....61
5.2.10 Determinação de EROs *in situ* 62
5.2.11 Determinação de O^{2-} e H_2O_2 63
5.2.12 Zimografia em gel....64
5.2.13 Zimografia *in situ* 66
5.2.14 Infiltrado inflamatório e colágeno 67
6 DISCUSSÃO 70
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS 81
REFERÊNCIAS 82
ANEXO 96

1 INTRODUÇÃO

A Produtos alimentícios à base de gordura e açúcar refinado são amplamente consumidos, principalmente no mundo ocidental, e têm chamado a atenção por poderem afetar o desenvolvimento e o prognóstico de doenças metabólicas, resultando em lesões cardiovasculares (Matsumoto; Park; Kohyama, 2009; Mu *et al.,* 2024; Shab-Bidar *et al*., 2014). Assim, para elucidar os mecanismos que desencadeiam os danos causados por essas dietas, surgiram diferentes protocolos experimentais de consumo dessas dietas em roedores (Hazra *et al*., 2019; Oliveira *et al*., 2013; Vileigas *et al*., 2021), tendo destaque a dieta rica em carboidratos refinados (HC).

Estudos indicam que a dieta HC está ligada a expansão do tecido adiposo, e à liberação de mediadores inflamatórios (Ferreira *et al*., 2014; Oliveira *et al*., 2013), que estão diretamente relacionados aos danos cardíacos (Nakayama; Wang, 2010). Camundongos submetidos a dieta HC apresentam um aumento da peroxidação lipídica cardíaca (Bruno *et al.,* 2023), corroborando os estudos em que o consumo de algum tipo dieta à base de carboidratos, apresentaram aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) e diminuição da atividade de enzimas antioxidantes no tecido cardíaco (De Barrios Freitas *et al.*, 2017; Roberts *et al.*, 2000; Venkateshan *et al.*, 2016; Vileigas *et al.*, 2021).

O aumento de ERO, por sua vez, resulta na ativação de metaloproteinases (MMPs), endopeptidases cálcio-dependentes, que são responsáveis pelo processo de remodelamento tecidual (Bruno *et al.*, 2023; Ferreira *et al.*, 2014; Guimarães *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2013). Nesse sentindo, camundongos que receberam dieta HC apresentam aumento de metaloproteinase -2 (MMP-2), necrose e fibrose do tecido cardíaco, ocasionando diminuição da função cardiovascular (Bruno *et al.*, 2023).

Além disso, a dieta HC promove uma maior liberação de óxido nítrico (NO), culminando em uma maior atividade do eixo hipotálamo- hipófise-adrenal (HPA) (Gomes *et al.*, 2020), que é responsável pelas respostas ao estresse (Herman *et al.*, 2016). Assim, verifica-se um aumento do comportamento do tipo ansioso em camundongos expostos a dieta HC, o que sugere que a dieta possua

efeito ansiogênico (Santos *et al.*, 2018). Acredita-se que as alterações comportamentais estejam associadas a uma possível modulação da microbiota pelo consumo desse tipo de dieta. Estudos apontam que camundongos tratados com sacarose (Kong *et al.*, 2019) ou dieta ocidental (Turnbaugh *et al.*, 2009), assim como roedores submetidos a modelos de estresse agudo (Bailey *et al.*, 2011) e crônico (Zhang *et al.*, 2021), apresentam disbiose intestinal, com aumento de *Firmicutes* e diminuição de *Bacteriodetes.* Ainda, estudos clínicos relacionam esse perfil de disbiose a doenças mentais, como ansiedade e depressão (Chen *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2022; Xiong *et al.*, 2023).

O cloridrato de minociclina é um antibiótico que possui uma rápida absorção e penetra facilmente nos tecidos (Pereira-Maia *et al.*, 2010; Reis; Casteen; Ilardi, 2019; Romero-Perez *et al.*, 2008; Sapadin; Fleischmajer, 2006). Suas propriedades antioxidantes estão associadas a presença de anéis fenólicos em sua estrutura (Haghi-Aminjan *et al.*, 2018; Salameh *et al.*, 2015). As propriedades anti-inflamatórias, por sua vez, estão associadas a inibição da micróglia, que é fundamental no desenvolvimento e progressão de doenças relacionadas ao sistema nervoso central (SNC) e do sistema cardiovascular (Kraus *et al.*, 2005; Morimoto *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2019). Assim, observa-se o uso desse medicamento em modelos experimentais de depressão e ansiedade (Camargos *et al.*, 2020; Reis; Casteen; Ilardi, 2019; Zhang *et al.*, 2019) insuficiência cardíaca (Wang *et al.*, 2019) e isquemia/reperfusão (Salameh *et al.*, 2015).

Ainda, a minociclina é considerada um inibidor não seletivo das MMPs. Sua ação, possivelmente, está ligada a capacidade desse composto em ligar-se a íons metálicos, impedindo a ação dessas proteases. Dessa forma, ratos tratados com esse composto apresentaram diminuição dos níveis de MMP-2 e 9 quando submetidos a isquemia (Machado *et al.*, 2006) e de MMP-9 em modelos de miocardite autoimune (Matsumoto; Park; Kohyama, 2009). No entanto, ainda não se sabe se um tratamento com minociclina pode ter efeitos benéficos no modelo de exposição à dieta HC.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DANOS AO SISTEMA CARDIOVASCULAR ASSOCIADOS A DIETA HC

Os alimentos ultraprocessados caracterizam-se por possuírem uma alta densidade energética e altos índices de açucares refinados (Elizabeth *et al.*, 2020). Estudos indicam que esse tipo de alimentação está diretamente associado ao surgimento de doenças cardiovasculares (Alzoubi *et al.*, 2013; Bruno *et al.*, 2023; Hu, 2010; Yang *et al.*, 2014) e ao aumento da mortalidade (Dehghan *et al.*, 2017; Seidelmann *et al.*, 2018). É importante ressaltar, que os danos cardíacos podem decorrer de medidas adaptativas do coração ao grande consumo de carboidratos, ou a influência dos mesmos no metabolismo cardíaco (Bruno *et al.*, 2023; Johnson *et al.*, 2007).

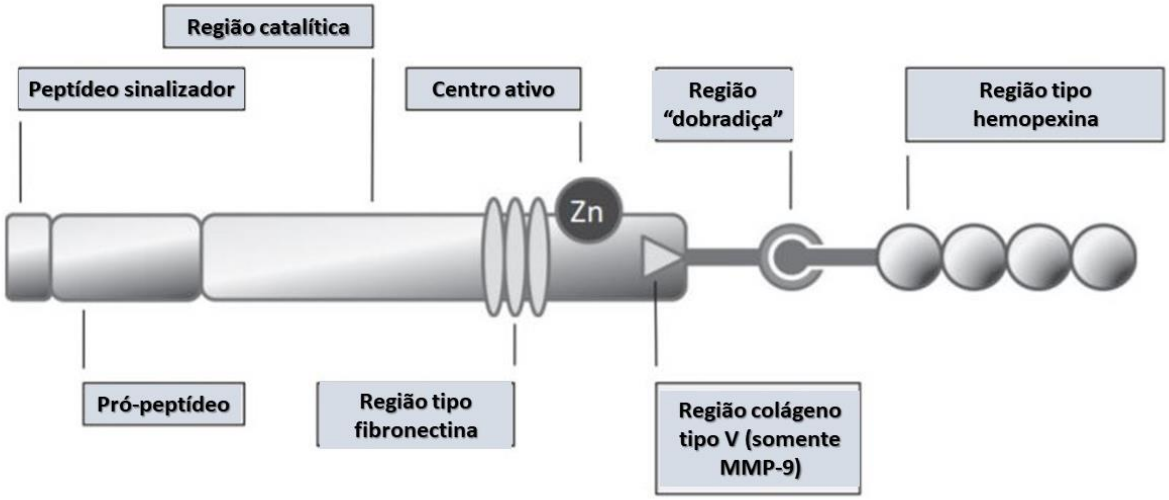
Sabe-se que, o consumo excessivo de carboidratos refinados contribui para a expansão do tecido adiposo, o que ocorre pelo alto índice glicêmico dessas dietas, que irá favorecer um aumento nos níveis de insulina pós-prandial e com isso a oxidação de glicose, pela insulina. Desse modo, observa-se o aumento dos depósitos de gorduras, pela maior incorporação de lipídios. Além disso, verifica-se um aumento da expressão de enzimas e fatores de transcrição que são responsáveis pelo metabolismo lipídico, como acetil-CoA carboxilase (ACC), lipoproteína lipase (LPL), proteína de ligação ao elemento responsivo a carboidratos (ChREBP), receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PPARγ) e proteína de ligação ao elemento regulador de esterol -1 (SREBP-1) (Ferreira *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2013). O aumento da adiposidade, por sua vez, irá promover a liberação de mediadores pró e anti-inflamatórios e disfunções metabólicas como resistência à insulina e intolerância à glicose (Oliveira *et al.*, 2013).

Bruno *et al.* (2023), demonstrou aumento na resistência à insulina e com isso diminuição da função cardíaca e hipertrofia ventricular esquerda em camundongos que consumiram dieta HC por 8 semanas. Ainda, foi observado aumento de MMP-2, que foi relacionado diretamente a processo de necrose e fibrose no tecido cardíaco desses animais (Bruno *et al.*, 2023).

As MMPs são uma família de mais de 20 endopeptidases. Elas são classificadas, com base em seus substratos, em colagenases, estromelisinas, matrilisinas, MMPs de membrana e gelatinases. As MMPs são dependentes de cálcio e são responsáveis pelo remodelamento da matriz extracelular. Essas proteases são formadas por um pró-peptídeo, um sítio catalítico contendo zinco, um peptídeo ligante e um domínio de hemopexina. Seu pró-peptídeo tem atividade inibitória, quelando o sítio ativo de zinco com um grupo cisteína sulfidrila, mantendo a MMP em sua forma zimogênica, isso é, no pró-forma latente (Figura 1). A atividade é adquirida pela protease quando ocorre a clivagem do resíduo de cisteína, com consequente rompimento do domínio inibitório, sendo que, isso pode ocorrer pela ação de compostos como plasminas, outras MMPs e peroxinitrito (Guimarães *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2007; Myasoedova *et al.*, 2018; Wang; Khalil, 2018) (Figura 2). Ainda, a atividade dessas enzimas também é regulada pelo equilíbrio entre as MMPs e seus inibidores teciduais (Garcia *et al.*, 2016; Guimarães *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2007).

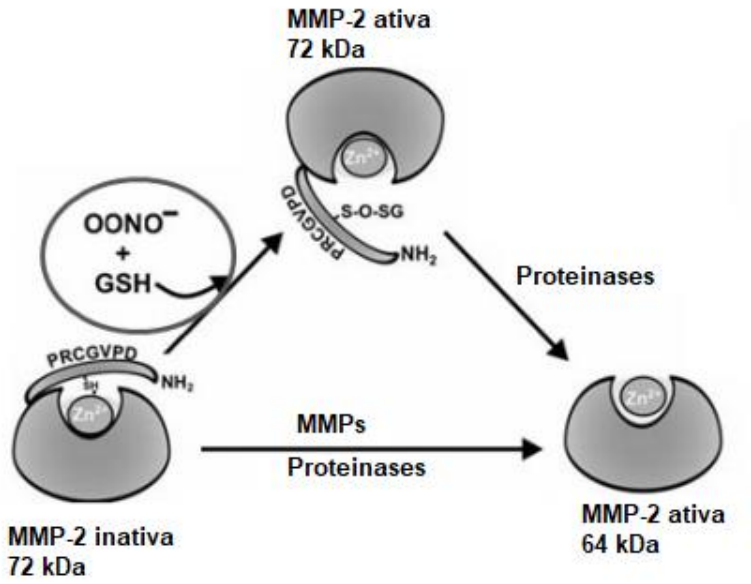
Dentre as MMPs, as de maior relevância nas doenças cardiovasculares são as gelatinases, responsáveis pela degradação do colágeno desnaturado e o colágeno intacto tipo IV (Henriet; Emonard, 2019; Kandasamy *et al.*, 2010). As gelatinases são representadas pela MMP-2, que é constitutiva, e a metaloproteinase- 9 (MMP-9), que é induzível (Guimarães *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2007). A MMP-2 apresenta papel proeminente na lesão cardíaca, pois também leva a lise de proteínas sarcoméricas, como troponina I e cadeia leve de miosina -1, tendo como consequência uma disfunção contrátil miocárdica (Ali *et al.*, 2012). A MMP-9 é responsável pelo processo de cicatrização de feridas no tecido cardíaco. Nesse sentindo, os mediadores inflamatórios irão influenciar a expressão de MMP-9, que, por sua vez, irá realizar uma retroalimentação, regulando a resposta inflamatória. Assim, em condições fisiopatológicas, as propriedades proteolíticas da MMP-9 estimulam a resposta inflamatória, sendo importantes nas fases de iniciação, execução e resolução de processos inflamatórios, contribuindo para a iniciação da patogênese e progressão das doenças (Becirovic-Agic *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2007; Yabluchanskiy *et al.*, 2013). Inibidores de MMPs, como a minociclina, tem sido utilizado nas doenças onde há excesso da atividade dessas enzimas (Myasoedova *et al.*, 2018).

Figura 1 – Estrutura geral das gelatinases MMP-2 e MMP-9. Apenas a MMP-9 possui a região semelhante ao colágeno do tipo V.



Fonte: Adaptado de Kurzepa *et al*., 2014.

Figura 2- Ativação das metaloproteinases de matriz 2, por meio das ERO e ERN.



Fonte: Adaptado de Kandasamy *et al*., 2010.

2.2 DANOS AO SNC E NA MICROBIOTA ASSOCIADOS A DIETAS RICAS EM CARBOIDRATOS

Conforme descrito anteriormente, o aumento do tecido adiposo é responsável por uma maior produção de NO, que atua como um facilitador dos estados de ansiedade, por regular o eixo HPA. Isso ocorre, devido a ativação das células microgliais, pela maior circulação de mediadores inflamatórios, principalmente macrófagos, culminando em uma regulação positiva da expressão do óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Gomes *et al.*, 2020; Mukherjee *et al.*, 2023; Sanchez; Guerin; Fonken, 2019). Santos *et al*. (2018) demonstraram que a exposição a uma dieta HC por 12 semanas, levou a uma diminuição da permanência dos camundongos nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE), que é um teste amplamente utilizado para caracterizar comportamentos semelhantes à ansiedade em roedores, após estes serem expostos a estresse de contenção por 2 horas, sugerindo que a dieta HC apresenta um efeito tipo ansiogênico. Além disso, estes animais apresentaram maior tempo de imobilidade no teste de suspensão pela cauda, indicando assim o desenvolvimento um comportamento do tipo depressivo (Pentkowski *et al*., 2021; Santos *et al.*, 2018).

Adicionalmente, foi observado um aumento do tempo de latência para comer em camundongos que receberam dieta HC durante 12 semanas, pelo teste de alimentação suprimido de novidade. Essa alteração comportamental foi seguida de aumento dos níveis de nitrito, sugerindo uma maior formação de NO (Gomes *et al.*, 2020). Complementarmente, um declínio cognitivo foi demonstrado em ratos que receberam uma dieta rica em sacarose como base, com prejuízos de memória (Alzoubi *et al.*, 2013) e aprendizado motor (Flores-Fuentes *et al.*, 2021).

Por outro lado, temos que o consumo de dietas ricas em açúcares é responsável por uma disbiose intestinal, isso é, um desequilíbrio da composição da microbiota intestinal (Howe *et al.*, 2016; Kong *et al.*, 2019). A microbiota intestinal é composta pelos filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacterias*. Os filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* são os mais abundantes e estão diretamente

relacionados com a modulação do sistema imune, e dessa forma, o desequilíbrio entre esses filos, levam a indução da inflamação e neuroinflamação (de Noronha *et al*., 2024; Vinke; El Aidy; van Dijk, 2017; Jandhyala *et al*., 2015).

Camundongos tratados com uma dieta rica em sacarose por 13 semanas apresentaram aumento de *Firmicutes* e *Proteobacterias*, com diminuição de *Bacteroidetes* (Kong *et al.*, 2019). Além disso, camundongos submetidos a uma dieta ocidental (rica em açúcares e gordura) por 4 (Fleissner *et al.*, 2010) e 8 semanas (Turnbaugh *et al.*, 2009), também apresentaram aumento de *Firmicutes* em relação aos *Bacteroidetes*. Semelhantemente, observa-se uma diminuição de *Bacteroidetes* e aumento de *Firmicutes* em roedores submetidos a modelos de estresse agudo (Bailey *et al.*, 2011) e crônico (Zhang *et al.*, 2021) ou em humanos com quadros de ansiedade (Kim *et al*., 2022) e depressão (Chen *et al.,* 2018). Assim, as variações nas proporções entre esses filos não se relacionam apenas com quadros de obesidade (Lau *et al.*, 2016), mas também com o desenvolvimento de doenças mentais, como ansiedade e depressão, segundo estudos clínicos e pré-clínicos (Xiong *et al.*, 2023).

Diante disso, sugere-se que as alterações de humor podem estar associadas a comunicação bidirecional do eixo intestino-cérebro, onde o nervo vago aferente seria o principal canal, levando informações para o SNC e recebendo informações dele. Ainda, as alterações na produção de substâncias como serotonina e dopamina e a inflamação gerada pelas dietas ricas em açúcares podem atuar modulando as respostas cerebrais (Collins; Surette; Bercik, 2012; Cryan; Dinan, 2012; Winter *et al.*, 2018). Por fim, acredita-se que a inflamação de baixo grau seria o ponto de ligação entre a obesidade e os transtornos de humor (Naseribafrouei *et al.*, 2014). Nesse sentido, embora já tenham sido observadas alterações comportamentais na dieta HC, conforme mencionado acima, ainda não se sabe se ocorre disbiose pelo consumo dessa dieta.

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO E ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES

Os mediadores inflamatórios liberados durante o consumo da dieta HC, culminam no processo de estresse oxidativo. Desse modo, observa-se que

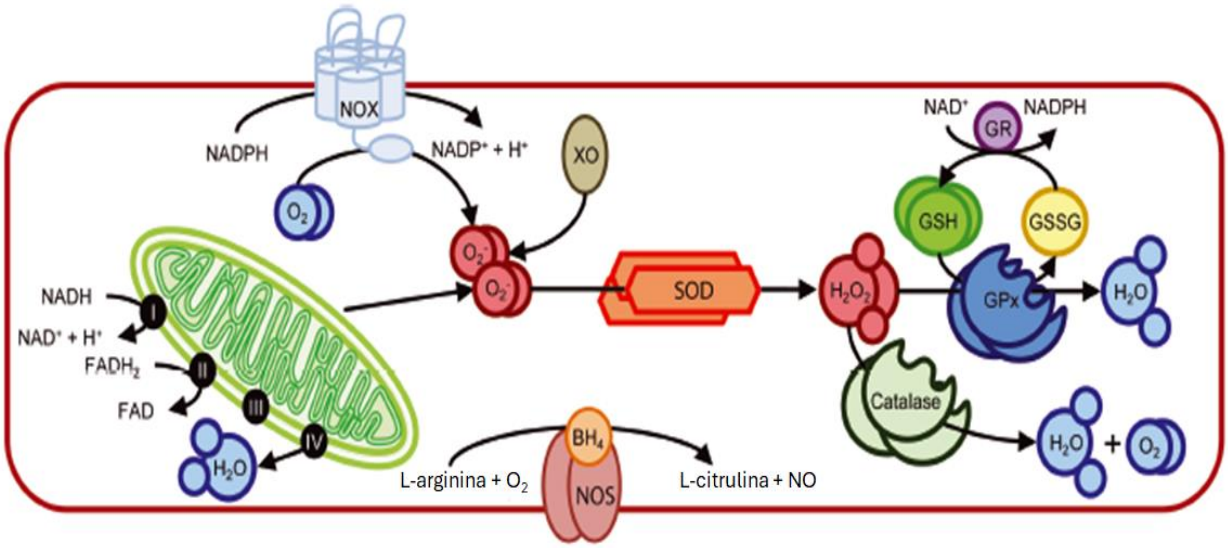
camundongos tratados com dieta HC por 4 semanas apresentam um aumento da peroxidação lipídica e ERO no tecido cardíaco (Bruno *et al*., 2023). Esses dados vão ao encontro de estudos anteriores, que, ao avaliarem os efeitos dos carboidratos de forma geral em roedores, observaram aumento de malonaldeído (MDA) (Vileigas *et al.*, 2021; De Barrios Freitas *et al.*, 2017), nitrotirosina (Roberts *et al.*, 2000), bem como diminuição da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e glutationa peroxidase (GPx) (De Barrios Freitas et al., 2017; Venkateshan et al., 2016) no tecido cardíaco.

O estresse oxidativo é definido como o desequilibrio entre a produção de ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) e seu sistema antioxidante (Kładna *et al.*, 2012; Tsutsui; Kinugawa; Matsushima, 2011; Valko *et al.*, 2006, 2007). Sendo que, os danos gerados por esse processo relacionam-se ao surgimento e manutenção de doenças cardiovasculares, como hipertensão, insuficiência cardíaca e aterosclerose (Jensen *et al.*, 2013; Kameda *et al.*, 2003; Tsutsui; Kinugawa; Matsushima, 2011; Valko *et al.*, 2007). As ERO e ERN são produtos originados do metabolismo celular e estão ligados a atividade de sinalização intracelular. São derivados da cadeia mitocondrial, da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (NOX) e da xantina oxidase e do óxido nítrico sintase (NOS) (Van der Pol *et al.*, 2019). Os principais representantes são o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o NO (Griendling; Sorescu; Ushio-Fukai, 2000; Tsutsui; Kinugawa; Matsushima, 2011; Valko *et al.*, 2006). O O_2^- é produzido pelo processo de respiração mitocondrial e NOX. A xantina oxidase, através da oxidação da hipoxantina e xantina em ácido úrico, produz O_2^- e H_2O_2. NOS, por sua vez, irá formar NO, utilizando o BH_4 como cofator (Van der Pol *et al.*, 2019).

O sistema de defesa enzimático, por sua vez, têm a função de controlar esses compostos e é formado pelas enzimas SOD, catalase e GPx *(Cnubben et al.*, 2001; Kładna *et al*., 2012). Resumidamente, a SOD tem a função de realizar a reação de dismutação, onde o O_2^- é convertido em H_2O_2 e oxigênio. A catalase, então, age diretamente nos radicais peróxidos formados pela SOD, transformando-os em água e oxigênio molecular, ela é uma enzima intracelular, sendo muito eficaz quando há estresse oxidativo elevado (De Barrios Freitas *et al.*, 2017; Roberts *et al.*, 2006). Por fim, a GPx reduz o H_2O_2 mediante oxidação da glutationa (GSH) a glutationa dissulfeto (GSSG). Desse modo, a GSH atua

em vários processos, como eliminação de radicais livres, redução de peróxidos, desintoxicação de compostos eletrofílicos, entre outros (Figura 3) (Cnubben *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 2006).

Figura 3 - Produção de ERO e defesa antioxidante enzimática.



Fonte: Adaptado Van der Pol *et al.*, 2019.

No entanto, quando há formação em excesso dos compostos oxidativos, ocorre um prejuizo no reparo realizado pelas enzimas antioxidantes culminando em processos nocivos de oxidação biológica (Kładna *et al.*, 2012). O excesso $O_2^{\cdot-}$, por exemplo, irá reagir com o NO formando peroxinitrito (Tsutsui; Kinugawa; Matsushima, 2011), um dos reponsáveis pela peroxidação lípidica (Griendling; Sorescu; Ushio-Fukai, 2000).

Nesse sentindo, substâncias que apresentam propriedades antioxidantes são estratégias contra o estresse oxidativo (Mota *et al.*, 2023), podendo trazer grandes benefícios a saúde humana (Escher *et al.*, 2018). Assim, estudos *in vitro* e *in vivo* desses compostos são utilizados para uma maior compreensão dos seus efeitos (Mota *et al.*, 2023). Testes *in vitro* químicos, como folin-ciocalteu, capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) e atividade redutora do radical hidroxila ($^{\cdot}OH$), são métodos rápidos e de baixo custo para triagem do potencial antioxidante de uma substância (Cruz *et al.*, 2024; Granato *et al.*, 2011). Contundo, esses testes apresentam certas limitações, como diferenças de pH, temperatura e sondas que não estão presentes em sistemas biológicos

(Granato, 2023; Cruz *et al*., 2024). Desse modo, os testes *in vitro* celulares emergem como complemento das análises químicas, pois, estão mais relacionados com os sistemas biológicos, tendo destaque o uso de eritrócitos (Liu; Huang, 2015; Mota *et al*., 2023), que contêm um importante sistema antioxidante, e, por isso, são conhecidos como uma proteção direta do organismo humano (Remigante *et al.*, 2022).

Adicionalmente, ressalta-se a importância da via oral para administração de medicamentos. Dessa forma, o processo de digestão simulada que simula as condições fisiológicas *in vivo*, permite uma triagem mais ampla do potencial de cada composto. É considerado, uma alternativa mais rápida, menos dispendiosa e menos trabalhosa de avaliar a bioacessibilidade e a bioatividade de uma molécula (Minekus *et al.*, 2014, Mota *et al*., 2023).

Por fim, a associação de testes químicos e em células permite traçar a capacidade antioxidante de dada substância. No entanto, os *estudos in vivo*, são cruciais para comparar, se os efeitos encontrados *in vitro*, serão reproduzíveis, por apresentarem maior similaridade metabólica, funcional e molecular com a fisiologia humana (Mota *et al.*, 2023).

2.4 MINOCICLINA

O cloridrato de minociclina é uma tetraciclina de amplo espectro, apresenta ação contra antimicrobianos ao inibir a síntese de proteínas, agindo na subunidade ribossômica 30S da bactéria e, com isso, impede a adição de aminoácidos para a formação da cadeia peptídica (Pereira-Maia *et al.*, 2010; Romero-Perez *et al.*, 2008; Sapadin; Fleischmajer, 2006). Possui uma rápida absorção, apresentando entre 95-100% de biodisponibilidade, além de penetrar facilmente nos tecidos (Agwuh; MacGowan, 2006; Singh *et al.*, 2022). No entanto, a minociclina tem sido utilizada no tratamento de diferentes patologias, não relacionadas a sua ação antimicrobiana, como a esclerose, a doença de Parkinson (Morimoto *et al.*, 2005), a depressão e ansiedade (Camargos *et al.*, 2020; Reis; Casteen; Ilardi, 2019; Wang *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019), a insuficiência cardíaca (Wang *et al.*, 2019) e nos danos cardíacos induzidos por isquemia/ reperfusão (Salameh *et al.*, 2015).

Seus efeitos benéficos em diferentes patologias têm sido associados às propriedades antioxidantes, ação inibitória de MMPs e anti-inflamatórias. Conforme citado anteriormente, a atividade antioxidante da minociclina se relaciona diretamente com a presença do anel fenólico em sua estrutura e indiretamente mediante modulação de agentes antioxidantes celulares (Haghi-Aminjan *et al.*, 2018; Salameh *et al.*, 2015). Nesse sentindo, estudos *in vitro* avaliaram o potencial antioxidante desse composto pela redução do radical DDPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e encontraram efeito antioxidante semelhante ao da vitamina E, que é um antioxidante fenólico. Ainda, a atividade antioxidante da minociclina frente ao radical DPPH foi melhor que a de outros fármacos do mesmo grupo (clorotetraciclina, doxiciclina, tetraciclina e demeclotetraciclina) (Kładna *et al.*, 2012; Kraus *et al.*, 2005).

Em estudos *in vivo*, como no modelo experimental de infarto do miocárdio em ratos, o tratamento com minociclina levou a melhora da disfunção cardíaca (tamanho do infarto, fração de ejeção e pressão diastólica final) (Wang *et al.*, 2019). Além disso, o tratamento com minociclina em modelo de isquemia/reperfusão cardíaca levou a uma diminuição da relação GSSG/GSH em ratos (Romero-Perez *et al.*, 2008) e dos marcadores de apoptose e das ERO e ERN em coelhos (Salameh *et al.*, 2015), reduzindo assim o estresse oxidativo.

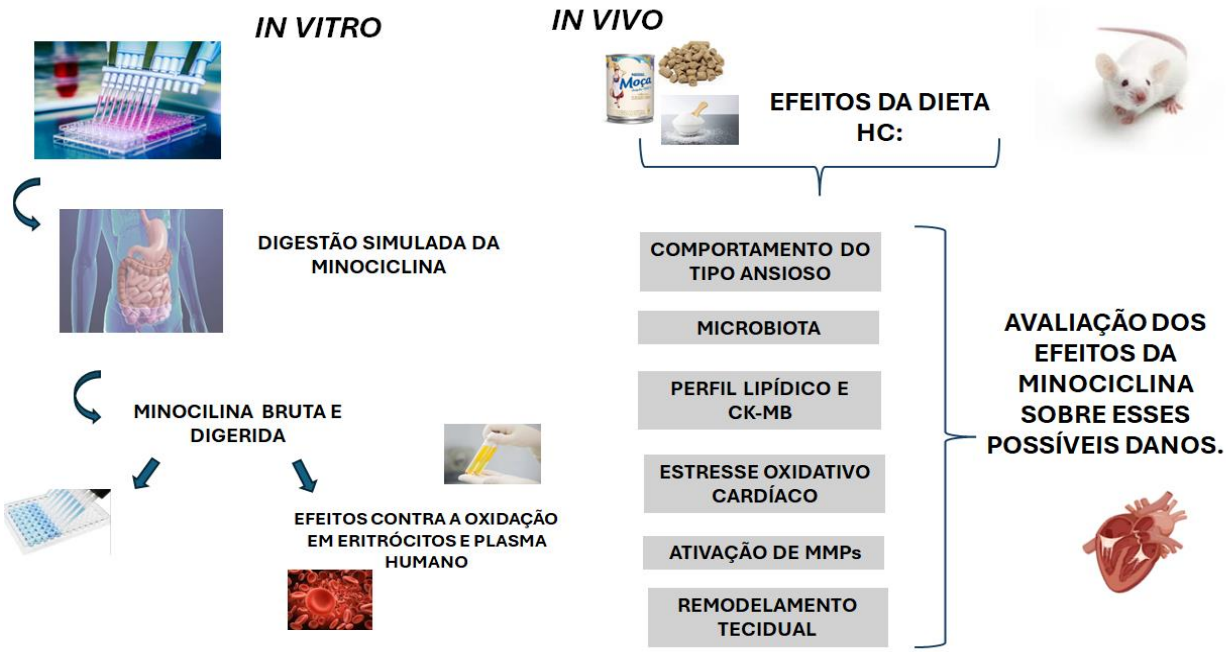
As tetraciclinas também são conhecidas como inibidoras não seletivas das MMPs. Acredita-se que sua ação está na capacidade de ligar a íons metálicos, como cálcio e zinco, impedindo a atividade dessas proteases. Dentre as tetraciclinas, a minociclina é considerada um dos melhores inibidores de gelatinases, além de ser um medicamento de baixo custo e de uso aprovado em humanos (Hu *et al.*, 2007). Observa-se que a minociclina atuou reduzindo os níveis de MMPs cardíaca, além do tamanho do infarto do miocárdio em ratos que passaram por isquemia/reperfusão (Romero-Perez *et al.*, 2008). Ainda, o tratamento com minociclina diminuiu os níveis de MMPs em cérebros de ratos submetidos a acidente vascular cerebral isquêmico (Machado *et al*., 2006). Em humanos com acidente vascular cerebral, a minociclina preveniu o agravamento de lesões isquêmicas pela redução das MMPs, (Garrido-Mesa; Zarzuelo; Gálvez, 2013).

A minociclina também possui efeitos inibitórios na micróglia do cérebro, células primárias do SNC que medeiam a neuroinflamação (Kraus *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2019). A neuroinflamação não apresenta papel crucial apenas no desenvolvimento de depressão e ansiedade, mas também colabora nas fisiopatologias de doenças cardiovasculares, como a insuficiência cardíaca; pois promove o aumento de citocinas pró-inflamatórias e angiotensina II. O aumento da angiotensina II contribui para uma maior ativação das células da micróglia, nos núcleos regulatórios cardiovasculares, elevando as ERO nessa região, levando, desse modo, a uma disfunção cardíaca. O tratamento de camundongos submetidos a danos neuronais isquêmicos ou indução de estresse oxidativo no SNC por glutamato, com minociclina, culminou em efeitos neuroprotetores e diminuição da formação de radicais livres e a peroxidação lipídica no prosencéfalo desses animais (Morimoto *et al.*, 2005; Reis; Casteen; Ilardi, 2019).

De forma geral, a minociclina tem sido administrada principalmente por via oral (Wang *et al.*, 2019) e intraperitoneal em protocolos experimentais (Camargos *et al.*, 2020; Morimoto *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2019). No entanto, é importante ressaltar, que a via oral é uma das principais vias de administração de medicamentos, e por isso, elucidar perfil de ação de um composto após o processo de digestão é fundamental. Nesse sentido, embora a biodisponibilidade da minociclina seja elevada, ainda não se sabe se o processo digestivo pode interferir no seu potencial antioxidante.

Assim, o consumo de dieta HC leva ao aumento de estresse oxidativo, alterações cardiovasculares, e ao desenvolvimento de doenças relacionadas ao SNC. Ainda, a minociclina é um medicamento com atividade antioxidante, ação inibidora de MMPs e que apresenta efeitos cardiovasculares benéficos em diversas patologias. No entanto, ainda não se sabe se: o processo de digestão simulada seria capaz de alterar as propriedades antioxidantes desse composto; o tratamento com a minociclina seria capaz de reduzir as alterações cardíacas e comportamentais causadas pelo consumo de dieta HC em camundongos; a dieta HC causaria disbiose em camundongos e se ela seria modulada pelo tratamento com minociclina (Figura 4).

Figura 4 - Esquema geral do estudo.



Fonte: Da autora.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do processo de digestão simulada na atividade antioxidante da minociclina. E avaliar os efeitos do tratamento com minociclina nas alterações cardíacas, comportamentais e na microbiota de camundongos que receberam dieta HC por 12 semanas.

3.2 OBJETICOS ESPECÍFICOS

- Digestão *in vitro* da minociclina e avaliação dos efeitos do composto bruto e digerido sobre*:*

a) atividade antioxidante;
b) proteção dos eritrócitos humanos contra a oxidação;
c) e proteção contra a oxidação plasmática.

- Avaliar as alterações causadas pela exposição crônica a uma dieta HC em camundongos e os efeitos do tratamento com a minociclina sobre:

a) o comportamento do tipo ansioso;
b) a microbiota;
c) a determinação de parâmetros bioquímicos;
d) o estresse oxidativo cardíaco;
e) a atividade de MMPs;
f) e o remodelamento cardíaco.

4 MATERIAS E MÉTODOS

O presente estudo dividiu-se em duas partes. Primeiramente, avaliou-se os mecanismos associado à atividade da minociclina *in vitro*. Posteriormente, observou-se os efeitos do tratamento com minociclina nas alterações cardíacas, comportamentais e na microbiota de camundongos causados pelo consumo crônico de dieta HC.

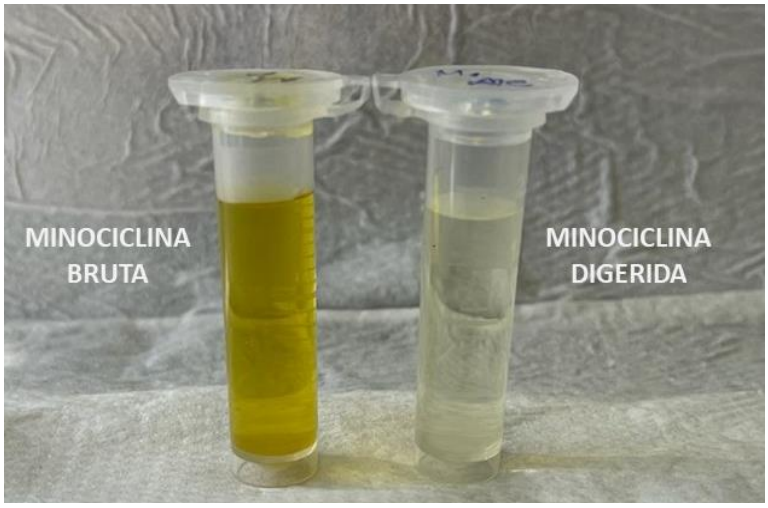
4.1 ENSAIOS *IN VITRO*

O estudo da minociclina *in vitro* foi realizada em parceria com o Prof. Dr. Daniel Granato. Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Bioatividade e Aplicações da Universidade de Limerick, em Limercik, Irlanda.

4.1.1 Digestão

A minociclina é utilizada na dose convencional de 100 mg (ANVISA). Nesse sentindo, para o processo de digestão *in vitro* “INFOGEST”, utilizou uma concentração de 20 mg/mL (0,04 mol/L), onde foi utilizado 5 mL para o teste. O teste é dividido em fase oral, gástrica e intestinal. Para a fase oral foram adicionados: 4 mL de fluido salivar, 475 µL água destilada, 25 µL $CaCl_2$ e 500 µL de amilase, incubando a 37°C por 2 minutos e 100 rpm. Após dois minutos, adicionou-se 8,5 mL de fluido gástrico, 5 µL $CaCl_2$, ajustando o pH para 3 com 11 µL HCl. Em seguida foi adicionado 984 µL de água destilada e 500µL de pepsina, incubando a 37°C por 2h e 100 rpm. Depois de 2 horas, adicionou-se 8,5 mL fluido intestinal, 40 µL $CaCl_2$, ajustando o pH para 7 com 4 µL de NaOH. Logo após, adicionou-se 3956 µL água destilada, 2,5 mL de bile e 5 mL de pancreatina, incubando novamente por 2 h nas mesmas condições. Após esse período, a solução foi centrifugada por 5 min, 10000 rpm, 4° C. O sobrenadante foi coletado, obtendo um volume final de 42 mL. Portanto, a concentração final da amostra digerida foi de 2,38 mg/mL (0,005 mol/L) (Figura 5) (Brodkorb *et al.*, 2019; Minekus *et al.*, 2014).

Figura 5 - Minocilina bruta e digerida.



Fonte: Da autora.

4.1.2 Atividade antioxidante da minociclina digerida e não digerida

Para determinação da atividade antioxidante utilizou-se os seguintes testes: atividade redutora do reagente de Folin-Ciocalteu, atividade de captura do $^{\cdot}OH$ e ORAC. A concentração utilizada de minociclina foi de 20 mg/mL (0,04 mol/L) para o composto não digerido e 2,38 mg/mL (0,005 mol/L) para o composto digerido (cálculo descrito anteriormente). Os experimentos foram realizados em quadruplicata.

Para a determinação de Folin-Ciocalteu, adicionou-se 25 µL de amostra, 200 µL de água destilada, 25 µL de Folin-Ciocalteu e após 5 minutos 25 µL de carbonato de sódio. A leitura foi realizada em leitor de microplacas, após 60 minutos a 725 nm. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (R^2= 0,9983; faixa de trabalho 16 a 160 mg/L) (Margraf *et al.*, 2015).

Para determinar a atividade de captura do $^{\cdot}OH$, 375 µL de amostra foram incubadas com 75 µL de $FeSO_4$.7 H2O (1 mmol/L) e 50 µL de H_2O_2 (15 mmol/L). Após 5 minutos, adicionou-se 375 µL de fenantrolina (1 mmol/L). A leitura foi realizada em leitor de microplacas, a 536 nm após 20 minutos. Os resultados

foram expressos em mg de ácido gálico por grama de amostra (R^2= 0,989; faixa de trabalho 25 a 1,5625 mg/L) (Mukhopadhyay *et al.*, 2016).

Por fim, o ORAC avalia o tempo e grau de inibição de determinado antioxidante, sendo, portanto, uma técnica de área sob a curva. Para o teste, 25 µL de amostra foram incubados com 150 µL de fluoresceína (40 nmol/L) por 30 minutos a 37°C. Após esse período adicionou-se 25 µL de dicloridrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) (153 mmol/L), um indutor de radicais peroxil, e realizou-se a leitura por fluorescência, em leitor de microplacas, durante 90 minutos (excitação: 485 nm, emissão: 535 nm). O branco continha apenas PBS e o controle negativo continha no lugar da amostra 25 µL de PBS. Para a análise, somente foram usados os 60 poços internos da placa de 96 poços. Os poços externos, foram colocados 275 µL de água, para evitar o efeito da temperatura. Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico equivalente por grama de amostra (R^2= 0,9872; faixa de trabalho 2,5 a 150 µmol/L) (Granato *et al.*, 2011).

4.1.3 Proteção dos eritrócitos humanos contra a oxidação

A atividade antioxidante e proteção celular em eritrócitos foi determinado da seguinte forma: o sangue humano de um voluntário saudável foi coletado em tubos contendo heparina. Os eritrócitos foram separados do plasma e lavados com PBS (5 mmol/L) centrifugando 3 vezes (1200 g, 5 minutos) (Comitê de ética 2023_02_01_S&E, Universidade de Limerick, Irlanda) (Anexo A). Durante cada lavagem, o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, os eritrócitos foram suspensos em PBS a 20%. Para o protocolo, 100 µL de suspensão de eritrócitos foram incubados a 100 µL de PBS (controle positivo), quercetina nas concentrações de 25 e 50 mg/mL (padrão) ou amostra de minociclina bruta e digerida nas concentrações de 25,50 e 100 µg/mL por 20 minutos, á 37°C e 150 RPM. Em seguida, adicionou-se 200 µL de AAPH (200 mM) por 2 horas, 37°C e 150 RPM, promovendo assim a reação de oxidação eritrocitária. Para o controle negativo utilizou-se apenas PBS + eritrócitos. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados a 1200 g por 10 minutos. Para avaliação dos processos oxidativos, após a centrifugação, o sobrenadante foi utilizado para dosar a hemólise

induzida por AAPH e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e o sedimento foi utilizado para avaliação dos níveis intracelulares de ERO. O ensaio foi realizado em quadruplicata.

Para a determinação da hemólise 100 µL foi adicionado a 200 µL de PBS. A total hemólise por sua vez, foi determinada usando 100 µL de suspensão de eritrócitos e 300 µL de água destilada, após, centrifugou-se a 1200g por 10 minutos a 4°C. A leitura foi realizada em 523 nm, em leitor de microplacas A porcentagem de hemólise foi calculada pela seguinte fórmula: $((A_{amostra} - A_{branco}) / (A_{total\ hemólise} - A_{branco})) *100$ (Liu; Huang, 2015; Remigante *et al.*, 2022).

A peroxidação lipídica foi realizada pela adição de 250 µL do sobrenadante a 250 µL de ácido tricloroacético e centrifugado a 1200g por 10 minutos. Após a centrifugação, 300 µL do sobrenadante foram adicionados a 300 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (1%) por 30 minutos a 95°C. A reação foi resfriada em banho de gelo e a absorbância medida em leitor de microplacas, a 532 nm. Para o controle positivo substituiu amostra por PBS. A taxa de peroxidação lipídica foi calculada pela seguinte fórmula: $((A_{amostra} - A_{branco}) / (A_{controle\ positivo} - A_{branco})) *100$ (Liu; Huang, 2015; Remigante *et al.*, 2022).

Para mensurar os níveis intracelulares de ERO, o sedimento foi lavado com 400 µL PBS e centrifugados a 1200 g por 3 minutos. Após, as células foram suspensas em 400 µL de solução de diacetato de 2',7'- diclorofluoresceína (DCFH-DA) (100 µM) e 300 µL foram transferidos para uma microplaca e incubado a 37°C por 20 minutos, em ausência de luz. A intensidade de fluorescência foi medida em 485 e 520 nm, em leitor de microplacas, e a geração de ERO foi calculada pela seguinte fórmula: $((A_{amostra} - A_{branco}) / (A_{controle\ positivo} - A_{branco})) *100$ (Liu; Huang, 2015; Remigante *et al.*, 2022).

Para avaliação da atividade das enzimas antioxidantes, após o processo de centrifugação, adicionou-se 0,6 mL de água destilada a fim de promover a lise celular. O lisado celular foi centrifugado a 1200g por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade das enzimas (Liu; Huang, 2015; Remigante *et al.*, 2022). A concentração proteica de cada amostras foi mensurada utilizando-se o método de Bradford (Ernst; Zor, 2010).

Para a determinação da catalase, monitorou-se a velocidade de decomposição do H_2O_2 por 60 segundos, utilizando espectrofotômetro. O resultado foi obtido subtraindo o valor inicial de absorbância do valor final e expressos como U/mg proteína, onde U corresponde à atividade da enzima que promove a hidrólise de 1 µmol de H_2O_2 por minuto (Aebi, 1984).

Para a determinação da atividade da SOD as amostras foram incubadas com 50 µL de Hidroxilamina, 100 µL de hipoxantina e 100 µL de xantina oxidase, deixando em banho maria a 37° C por 30 minutos. Depois, 1 mL do reagente C (solução de ácido sulfanílico, α-naftilenodiamino e ácido acético glacial) foi adicionado, deixando em temperatura ambiente por 20 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em 550 nm. Os resultados foram expressos em U/mg proteína, na qual 1 U corresponde à atividade da enzima capaz de inibir 50% da reação (Yanagui, 1984).

4.1.4 Proteção contra a oxidação plasmática

Para testar a atividade antioxidante da minociclina contra os produtos de oxidação fluorescente (FIOP's), utilizou-se plasma humano de um voluntário saudável (Comitê de ética 2023_02_01_S&E, Universidade de Limerick, Irlanda) (Anexo A). O plasma heparinizado foi separado por centrifugação (900 g, 5 minutos). Em seguida 200 µL de plasma foi adicionado a 50 µL de amostra ou PBS (controle) e incubado por 15 minutos á 37°C. Após esse período, adicionou-se 100 µL de $CuCl_2$ (300 µmol/L) e incubou por 120 minutos a 37°C e 150 rpm. Á seguir, adicionou-se 1 mL de etanol - éter (3:1 v/v) aos tubos, agitando em vórtex e centrifugando a 12000g por 3 minutos. Transferiu-se 200 µL do sobrenadante para uma microplaca e a fluorescência foi medida em A) $\lambda_{Excitação}$ = 360 nm, $\lambda_{Emissão}$ = 420 nm (para mensurar FIOP's total), (B) $\lambda_{Excitação}$ = 320 nm, $\lambda_{Emissão}$ = 420 nm (para mensurar hidroperóxidos lipídicos), (C) $\lambda_{Excitação}$ = 400 nm, $\lambda_{emissão}$ = 475 nm (para mensurar MDA), utilizando leitor de microplacas. Os resultados foram expressos em porcentagem em comparação com o branco (Jensen *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2007). O ensaio foi realizado em sextuplicata.

4.2 ENSAIOS *IN VIVO*

4.2.1 Protocolo experimental

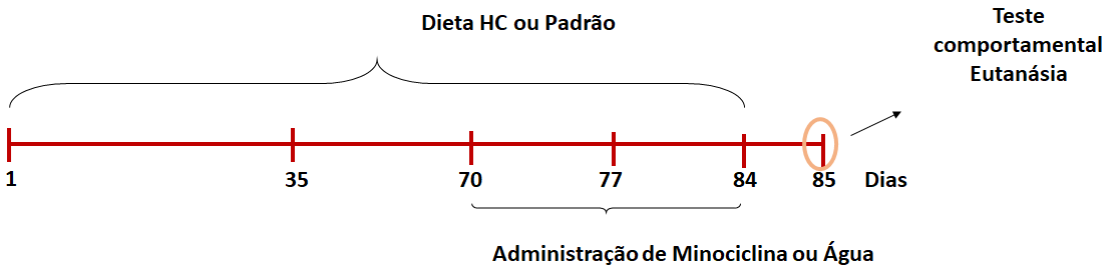
Camundongos Balb/C, machos, entre 6 a 7 semanas, foram obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-UFMG) e mantidos agrupados no biotério do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, com ciclo claro-escuro 12 horas, ração e água *ad libitum*. O protocolo a ser seguido foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG), protocolo 065/2017 (Anexo B). Os animais foram inicialmente divididos em dois grupos. Um grupo recebeu ração padrão para roedores (Nuvilab-CR1) e outro recebeu a dieta HC durante 12 semanas. A dieta HC foi constituída de 45% de leite condensado, 10% de açúcare 34 % de dieta padrão (Oliveira *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2018). Quanto a concentração de macronutrientes, a dieta padrão apresentou 65,8% de carboidratos, 3,2% de gorduras e 31 % de proteína; possuindo 4 kcal/g. Já a dieta HC, é composta por 74,2% de carboidratos, 5,8% de gorduras, 20% de proteína e 4,4 Kcal/g (Oliveira *et al.*, 2013). A dieta foi preparada no laboratório uma vez por semana e congelada, afim de manter a qualidade da alimentação.

O controle de peso e a de ração foram monitorados durante todo o protocolo. Na 10° semana, cada grupo foi subdividido em dois grupos, um deles recebeu o cloridrato de minociclina diluído em água destilada na dose de 50 mg/kg/dia e o outro recebeu água destilada, por gavagem, durante 15 dias. Portanto, o protocolo experimental constituiu de 4 grupos: dieta padrão + água, dieta padrão + minociclina, dieta HC + água, dieta HC + minociclina; sendo que cada grupo era composto por 17 animais. A dose foi baseada em estudos anteriores, onde o tratamento com minociclina nessa concentração atuou contra o comportamento do tipo ansioso (Han *et al.*, 2020; Wang *et al*., 2019; Kumar *et al.*, 2012) e danos cardiovasculares (Wang *et al*., 2019). Acrescenta-se, que asolução de cloridrato de minociclina foi preparada no momento da administração, com luz apagada e auxílio de recipientes âmbar. O pH foi conferido antes da aplicação para garantir que não houvesse degradação. O

cloridrato de minociclina apresenta alta solubilidade em água, formando uma solução ácida e bastante estável. Porém, para garantir sua estabilidade a solução não deve apresentar pH abaixo de 2 e não estar em soluções de hidróxidos alcalinos. Além disso, o pó foi mantido em ausência de luz intensa e umidade. É importante ressaltar que, após algum tempo de repouso, a solução se torna turva, indicando assim sua degradação e, portanto, não pode ser mais utilizada (Leitão, 2001).

Ao final do tratamento, após coleta das fezes, os animais foram submetidos a teste comportamental de LCE e eutanasiados por decapitação. Foram coletados o sangue, coração e tecido adiposo (retroperitoneal, mesentérico e epididimal) (Figura 6).

Figura 6 - Desenho experimental.



Fonte: Da autora.

4.2.2 Índice de adiposidade

O tecido adiposo branco foi previamente coletado, pesado e utilizado para o cálculo do índice de adiposidade, que é um dos parâmetros utilizados para caracterizar o modelo de exposição a dieta HC em camundongos. Esse índice foi calculado pelo somatório do peso dos tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérico (Pta), multiplicado por 100 e dividido pelo peso corporal (Pc) (Oliveira *et al.*, 2013), conforme equação: *Índice de Adiposidade (%) = Pta x 100/ Pc.*

4.2.3 Avaliação comportamental

Um dia após a finalização do protocolo, foi realizada a avaliação comportamental pelo teste de LCE. O LCE consiste em dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois braços fechados de mesmo tamanho, porém, com paredes de 20 cm de altura. Os braços similares são cruzados em ângulo reto e conectados por uma área central. O aparelho é elevado a 60 cm do chão. A atividade foi registrada por 5 minutos, utilizando uma câmera digital. Posteriormente, foram analisados o tempo gasto na exploração dos braços abertos e fechados utilizando o *software EthoVision*® (Noldus, The Netherlands), a frequência de *grooming* (Silva *et al.*, 2022) e o número *head dipping* (Dalvi; Rodgers, 1999; Silva *et al.*, 2022).

4.2.4 Dosagem de corticosterona e determinação dos parâmetros bioquímicos

Após a eutanásia, o sangue foi coletado em tubos heparinizados e centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos, a 4°C. O plasma obtido foi utilizado nos ensaios. É importante ressaltar, que a coleta do sangue foi realizada no período da manhã, das 7 às 9 horas, a fim de garantir veracidade na dosagem de corticosterona.

Para a dosagem de corticosterona, 25 µL de plasma foi adicionado a 1 mL de etanol absoluto. Após agitação, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 3000 rpm e 4ºC. Os pellets foram desprezados, e os sobrenadantes coletados em novos tubos e submetidos a liofilização.

No dia do radioimunoensaio, as amostras liofilizadas foram reconstituídas com 2,5 mL de tampão gel e agitadas. As amostras então, foram analisadas em duplicatas de 500 µL e incubadas com o anticorpo anti-corticosterona (AB-cort-C8784-100TST) e com o antígeno marcado com trício (3H-corticosterona), para ensaio de competição. Para separação da fração livre da ligada, foi adicionada uma solução de carvão-dextran 0,5/0,05%, seguida por centrifugação a 2500 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi vertido em tubos apropriados contendo 2 mL de líquido de cintilação biodegradável (ScintiSafe Econo 1, Fisher Scientific

SX20-5) e a leitura foi realizada em cintilador para radiação β (Beckman, USA). A concentração mínima detectável foi de 0,12 µg/dL (Cruz *et al.*, 2012; Marin; Cruz; Planeta, 2007).

Para determinação do colesterol e triglicérides utilizou-se o teste enzimático colorimétrico seguindo as instruções dos kits (Bioclin, Brasil, Referência K083 e K117, respectivamente). Para ambos, 10 µL de amostra foi adicionado a 1 mL do reagente enzimático e levados a banho-maria por 10 minutos. Após esse processo, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 500 nm. Os resultados foram calculados multiplicando a absorbância da amostra pelo fator de calibração e expressos em mg/dL.

Para determinação da atividade de CK-MB (Creatinina Quinase fração MB), foi utilizado o teste cinético, seguindo as instruções do Kit (Bioclin, Brasil, Referência K069). Para o teste, 6 µL de amostra foi adicionado a 150 µL de reagente de trabalho (4 partes do tampão e 1 parte da enzima) em uma placa de ELISA e mantidos a 37°C por 5 minutos. Realizou-se a leitura em leitor de microplacas, a 340 nm, disparando o cronometro no tempo zero e repetindo as leituras no tempo 1, 2 e 3 com temperatura controlada a 37°C. Os resultados foram calculados através das diferenças de absorbância por minuto (ΔA/min) multiplicado por 8254 e expressos em U/L.

4.2.5 Extração de DNA fecal

Após a finalização do protocolo experimental, os animais foram acondicionados individualmente em caixas plásticas forradas com papel toalha estéril e esperou-se até que ele defecasse voluntariamente. Em seguida, com o auxílio de uma pinça, o material fecal foi transferido para um tubo eppendorf também estéril.

O ácido desoxirribonucleico (DNA) total foi extraído de amostras fecais dos grupos de acordo com os dados do fabricante do Mini Kit Stool QEAamp DNA (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EUA). *Pellets* fecais de cada grupo foram suspensos em solução salina estéril. O InhibitEX Buffer do kit foi utilizado para reduzir os efeitos dos inibidores da reação em cadeia da polimerase (PCR) nas amostras de fezes. O DNA total foi purificado em uma coluna QIAamp e

quantificado em fluorímetro Invitrogen Qubit Fluorometer (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Um nanograma de DNA total por amostra foi utilizado para analisar as sequências de ácido ribonucleico ribossômico 16S (rRNA) por qPCR (Reação em cadeia da polimerase em tempo real).

Tabela 1: Sequência dos primers dos filos bacterianos para análises de qPCR.

Primer	Sequência
Bactérias totais F	5"-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3"
Bactérias totais R	5"-AAGGAGGTGWTCCARCC-3"
Bacteroidetes F	5"-GTTTAATTCGATGATACGCGAG-3"
Bacteroidetes R	5"-TTAASCCGACACCTCACGG-3"
Gammaproteobacterias F	5"-GCTAACGCATTAAGTRYCCCG-3"
Gammaproteobacterias R	5"-GCCATGCRGCACCTGTCT-3"
Firmicutes F	5"-GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA-3"
*Firmicute*s R	5"-AGCTGACGACAACCATGCAC-3"

Fonte: do autor
Legenda: Símbolos dos nucleotídeos: R = A ou G; Y= C ou T; W= A ou T; S= C ou G.

4.2.6 Atividade da SOD

Amostras do tecido cardíaco coletadas e congeladas foram homogeneizadas com PBS pH 7,4 e levadas à centrífuga a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado no ensaio. Para determinação da atividade da SOD foi adicionado a 10 µL do sobrenadante, 50 µL de hidroxilamina, 100 µL de hipoxantina e 100 µL de xantina oxidase, deixando em banho maria a 37° C por 30 minutos. Depois, adicionou-se 1 mL do reagente C (solução de ácido sulfanílico, α-naftilenodiamino e ácido acético glacial), deixando em temperatura ambiente por 20 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em 550 nm. Os resultados foram expressos em U/mg proteína, na qual 1 U corresponde à atividade da enzima capaz de inibir 50% da reação (Yanagui, 1984). A concentração proteica de cada amostras foi mensurada utilizando-se o método de Bradford (Ernst; Zor, 2010).

4.2.7 Atividade da catalase

As amostras de tecido cardíaco coletadas e congeladas foram homogeneizadas com PBS pH 7,4 e levadas à centrífuga a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinar a velocidade de decomposição do H_2O_2 por 60 segundos, á 250 nm, por espectrofotômetro. Resumidamente, adicionou-se 1 µL da amostra a PBS, e após zerar o equipamento, adicionou-se solução de H_2O_2 a 100 mM. O resultado foi obtido subtraindo o valor inicial de absorbância do valor final e expressos como U /mg proteína, onde 1 U corresponde à atividade da enzima que promove a hidrólise de 1 µmol de H_2O_2 por minuto (Aebi, 1984). A concentração proteica de cada amostras foi mensurada utilizando-se o método de Bradford (Ernst; Zor, 2010).

4.2.8 Atividade da GPx

As amostras de tecido cardíaco coletadas e congeladas foram homogeneizadas com PBS pH 7,4 e levadas à centrífuga a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. Em seguida, 20 µL do sobrenadante foi incubado com GSH (6 mM), PBS pH 7,4, NADPH (1mM) e glutationa redutase (1,8 U) durante 3 minutos. Após esse período a reação foi iniciada pela adição de terc-butil-hidroperóxido (70 mM). Durante todo o experimento, a absorbância foi monitorada á 340 nm, 37°, sob agitação em espectrofotômetro. A cinética de oxidação do NADPH foi determinada através do coeficiente de extinção molar do mesmo, a 340 nm. O resultado foi obtido subtraindo os valores obtidos antes da adição do terc-butil-hidroperóxido dos valores obtidos na presença do mesmo e expressos como unidades/mg proteína, onde 1U corresponde à atividade da enzima capaz de hidrolisar 1 µmol de NADPH por minuto (Sinetx *et al.*, 1975). A concentração proteica de cada amostras foi mensurada utilizando-se o método de Bradford (Ernst; Zor, 2010).

4.2.9 Níveis de GSH

As amostras de tecido cardíaco coletadas e congeladas foram homogeneizadas com PBS pH 7,4 e levadas à centrífuga a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. Em seguida, 100 µL do sobrenadante foi adicionado a 100 µL de ácido tricloroacético (0,0125%), permanecendo ao gelo por 30 minutos e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. Em seguida, adicionou-se 100 µL da amostra, 200 µL de tampão tris pH 8,0 e 5 µL de ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoico) em placas de 96 poços (DTNB; 3,96 mg de DTNB em 1 mL de metanol). Quando o ácido entra em contato com o grupo SH – tiol dos grupos sulfidrílicos, produz uma coloração amarela, a qual é lida em leitor de microplacas, a 415 nm. Os valores foram expressos em µg GSH/mg de proteína (Simplicio *et al.*, 2015). A concentração proteica de cada amostras foi mensurada utilizando-se o método de Bradford (Ernst; Zor, 2010).

.

4.2.10 Determinação dos níveis de TBARS

Foi avaliada através da determinação de TBARS. O MDA é um produto natural formando pela peroxidação lipídica. Em altas temperaturas, o MDA reage com o TBA, formando o aducto MDA-TBA que pode ser medido por métodos colorimétricos (530-540 nm) ou fluorimétricos (530-540 nm).

Portanto, para esse o teste, amostras de tecido cardíaco coletadas e congeladas, foram homogeneizadas em tampão de lise (1 ml de PBS 10x; 0,1 ml de igepal; 0,05 g de deoxicolato de sódio; 0,1 ml de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%; água destilada qsp 10 ml; 4 µL de fluoreto de fenilmetanossulfonil e 5 µL do inibidor de protease) e centrifugadas a 1600 g por 10 minutos a 4°C. Para a realização do ensaio 150 µL do sobrenadante, foi adicionado a 25 µL de SDS 8,1% e 1 mL de reagente de cor (ácido acético, NaOH e TBA) e levados a 100°C por 1 hora. A leitura foi realizada em leitor de microplacas, a 540 nm. (TBARS *assay Kit, Cayman Chemical Company MODIFICADO)*. Os resultados foram expressos como nmol/mg proteína. A concentração proteica de cada amostras foi mensurada utilizando-se o método de Bradford (Ernst; Zor, 2010).

4.2.11 Determinação de ERO *in situ*

Para analisar os níveis de ERO *in situ* no coração foi utilizada uma sonda dihidroetídeo (DHE) em uma concentração de 10 µmol/l (Viel *et al.*, 2008). Os tecidos congelados em OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA), utilizando acetona e gelo seco foram cortados em criostato a 5 µm de espessura. Os cortes, foram incubados com DHE por 30 minutos em câmara úmida e escura e em seguida lavados com tampão PBS. Os cortes foram avaliados em microscópio de fluorescência acoplado a câmera fotográfica (Zeiss, AxioSCope A1) e as imagens foram fotografadas em aumento de 400x. A quantificação da intensidade de fluorescência vermelha emitida foi realizada utilizando o programa ImageJ.

.

4.2.12 Determinação de O_2^-

As amostras de tecido cardíaco coletadas e congeladas foram utilizadas para determinar a concentração de O_2^-, utilizando o ensaio de quimioluminescência derivado de lucigenina. Resumidamente, os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato e transferidos para placas de 96 poços. O substrato NADPH (0,1 mM) foi adicionado à suspensão contendo 50 µl do homogenato, lucigenina (5 µM) e tampão de ensaio. A luminescência foi medida utilizando um leitor de microplacas e os resultados foram expressos como unidades relativas de luz (RLU)/mg de proteína (Do Vale *et al.*, 2020). A concentração proteica de cada amostras foi mensurada utilizando-se o método de Bradford (Ernst; Zor, 2010).

4.2.13 Determinação de H_2O_2

O substrato fluorogênico Amplex® Red (#A22188, Invitrogen, Carlsbad, CA) foi utilizado para determinar a concentração de H_2O_2 em tecidos cardíacos.

As amostras coletadas foram homogeneizadas em solução de Krebs pH 7,4 e centrifugadas a 1000 xg, 10 min e 4°C. O sobrenadante (50 µl) foram incubadas por 30 min (no escuro a 25°C) com o reagente Amplex ® Red. A fluorescência foi analisada usando o espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse ($\lambda_{excitação}$= 571 nm, $\lambda_{emissão}$= 585 nm). Os resultados foram expressos como µmol H_2O_2 / mg de proteína (Carda *et al.*, 2015; Do Vale *et al.*, 2020). A concentração proteica de cada amostras foi mensurada utilizando-se o método de Bradford (Ernst; Zor, 2010).

4.2.14 Zimografia em gel

A quantidade de MMP-2 e MMP-9 nos tecidos cardíacos, foi determinada por meio da técnica de zimografia (Castro *et al.*, 2008; Ceron *et al.*, 2010; Martinez *et al.*, 2008). Trata-se de uma técnica em que um gel de eletroforese é copolimerizado ao substrato para as enzimas em estudo. O substrato utilizado foi a gelatina, devido ao fato das MMPs-2 e 9 serem gelatinases. As amostras de coração foram trituradas e homogeneizadas em tampão de extração (tampão $CaCl_2$ 10 mM, tris-HCl 50 mM, pH 7,4; contendo os inibidores de proteases NaF 50 mM, Ortov 50 mM, fenantrolina 20 mM; seguindo a seguinte proporção: 20 µL NaF, 20 µL Ortov, 50 µL fenantrolina para 910 µL de tampão). As amostras então foram centrifugadas a 4˚C a 3000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante separado.

Deste sobrenadante, quantificou-se a proteína por meio do método de Bradford (Ernst; Zor, 2010), e calculou um volume correspondente a 30 µg de proteína. Em seguida, transferiu-se a quantidade de cada amostra para a concentração de proteína determinada para tubos de 0,5 mL e adicionou a cada um deles a quantidade necessária de tampão de amostra não redutor 6X, congelou-se as amostras preparadas em -20˚C.

Para preparar os géis, fez-se inicialmente o gel de separação 10% (7,308 mL água destilada; 3,75 mL da solução 40% acrilamida/bisacrilamida; 3,75 mL de tampão tris Cl/SDS 4X pH 8,8; 0,188 µL de gelatina; 100 µL de persulfato de amônio; 20 µL de TEMED), e após polimerização, aplicou-se em cima o gel de

largada 3,9% (3,212 mL de água destilada; 0,488 µL da solução 40% acrilamida/bisacrilamida; 1,25 mL de tampão tris Cl/SDS 4X pH 6,8; 50 µL de persulfato de amônio; 10 µL de TEMED), inserindo junto a estes géis os pentes para a formação de poços. Antes de aplicar as amostras no gel, elas foram colocadas em banho-maria por 15 minutos a 37˚C.

O padrão utilizado na corrida foi o soro fetal bovino. Após eletroforese, estes géis foram submetidos a 2 banhos de 30 minutos de triton a 2%, para remover o SDS e foram colocados em solução tris-HCl 50 mM para a renaturação das proteínas e ativação enzimática, por 24 horas. Posteriormente, foram fixados e corados com solução *Coommassie Blue* 0,05% por 1,5 horas, levando a uma coloração completa do gel. Para a visualização das bandas correspondentes às MMPs em estudo, utilizou-se descorante feito de metanol a 30% e ácido acético a 10%, trocando o descorante em três tempos: 15 minutos, 30 minutos, e 60 minutos. Observou-se a degradação da gelatina incorporada ao gel por meio da formação de bandas claras contra o fundo azul do corante. A quantificação das bandas das MMPs foi realizada usando o programa de imagens ImageJ. A forma latente e ativa da MMP-2 e MMP-9 foram identificadas por meio do peso molecular: 72 kDa e 92 kDa, respectivamente.

4.2.15 Zimografia *in situ*

A zimografia *in situ*, é uma técnica que possibilita a detecção de atividade gelatinolítica diretamente no tecido. Ela tem como princípio a incubação de tecidos não fixados com um substrato específico, que ao ser degradado por gelatinases/colagenases presentes no tecido, são microscopicamente detectáveis sob fluorescência excitada. Quanto mais intensa a fluorescência, maior a atividade gelatinolítica (Frederiks; Mook, 2004)..

O tecido congelado com OCT (SAKURA FINETEK, TORRANCE, CA, USA) com acetona e gelo seco, foram seccionados em criostato com espessura de 5 µm. Para esta análise foi utilizado DQ gelatin (D12054, Thermo Fischer, EUA) na concentração de 1,0 µg/mL em tampão tris-CaCl 2 50 mmol/L.

Os cortes cardíacos foram incubados em 20 µL da solução de DQ, durante 30 minutos em câmara escura e úmida. Em seguida, os tecidos foram lavados 3 vezes com PBS pH7,4. Os cortes foram avaliados em microscópio de fluorescência acoplado a câmera fotográfica (Zeiss, AxioSCope A1) e as imagens foram fotografadas em aumento de 400x. A quantificação da atividade gelatinolítica *in situ* foi medida utilizando o programa ImageJ.

4.2.16 Histologia

Os corações dos animais foram fixados em paraformaldeído 4%, cortados médio-ventricular em duas partes e processados pela técnica de inclusão em parafina (Bruno *et al.*, 2023). Após a inclusão, os tecidos foram cortados em micrótomo rotativo (Leica: modelo RM2125RT, Nussloch-Alemanha), obtendo-se cortes de 5 µM de espessura que foram depositados em lâminas. Para avaliar a presença de infiltrados inflamatórios, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina e fotografadas utilizando o microscópio Zeiss AxioCam ICc3 acoplado ao software AxioVision, no aumento de 400x, capturando 10 imagens microscópicas para cada animal. Para a análise do colágeno, as lâminas foram coradas com *Picro Sirius red* e observadas sob microscopia de campo claro e luz polarizada (Mata-Santos *et al.*, 2014). As imagens foram capturadas em campos consecutivos no aumento de 200x, sem sobreposição, cinco foto por animal. A quantificação foi realizada utilizando o método de contagem de pontos do software Image- Pro Plus 6.3® e os resultados expressos em porcentagem (Rich; Whittaker, 2005).

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos no nosso estudo foram analisados com o programa *GraphPad Prism 8* e expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). A comparação entre dois grupos foi realizada pelo teste T para amostras pareadas. A análise envolvendo mais grupos foi realizada pela Análise de Variância (ANOVA *one way e two way*), seguida pelo pós-teste de

Tuckey's. Foram considerados significativos valores de $p<0,05$. Ressalta-se que os dados seguem uma distribuição normal, constatada pelo teste de Shapiro-Wilk.

5 RESULTADOS

5.1 ENSAIOS *IN VITRO*

5.1.1 Atividade antioxidante

Ao comparar a minociclina bruta com a minociclina digerida (Tabela 2), observa-se que a minociclina digerida demonstrou maior atividade redutora do reagente de Folin Ciocalteu e aumentou a eficiência do composto em capturar o ·OH. Além de aumentar a absorção de radicais de oxigênio.

Tabela 2 - Atividade antioxidante da minociclina bruta e digerida.

	Minociclina Bruta	**Minociclina digerida**
Atividade redutora do reagente Folin Ciocalteu (mg AGE/g)	473 ± 2	586,400 ± 8*
·OH scavenging (mg AGE/g)	52 ± 1	505,500 ± 6*
ORAC (µmol AAE/g)	2211 ± 30	16045 ± 319*

Fonte: Da autora.

Legenda: AGE: ácido gálico equivalente, AAE: ácido ascórbico equivalente. *p<0,05 monociclina bruta.

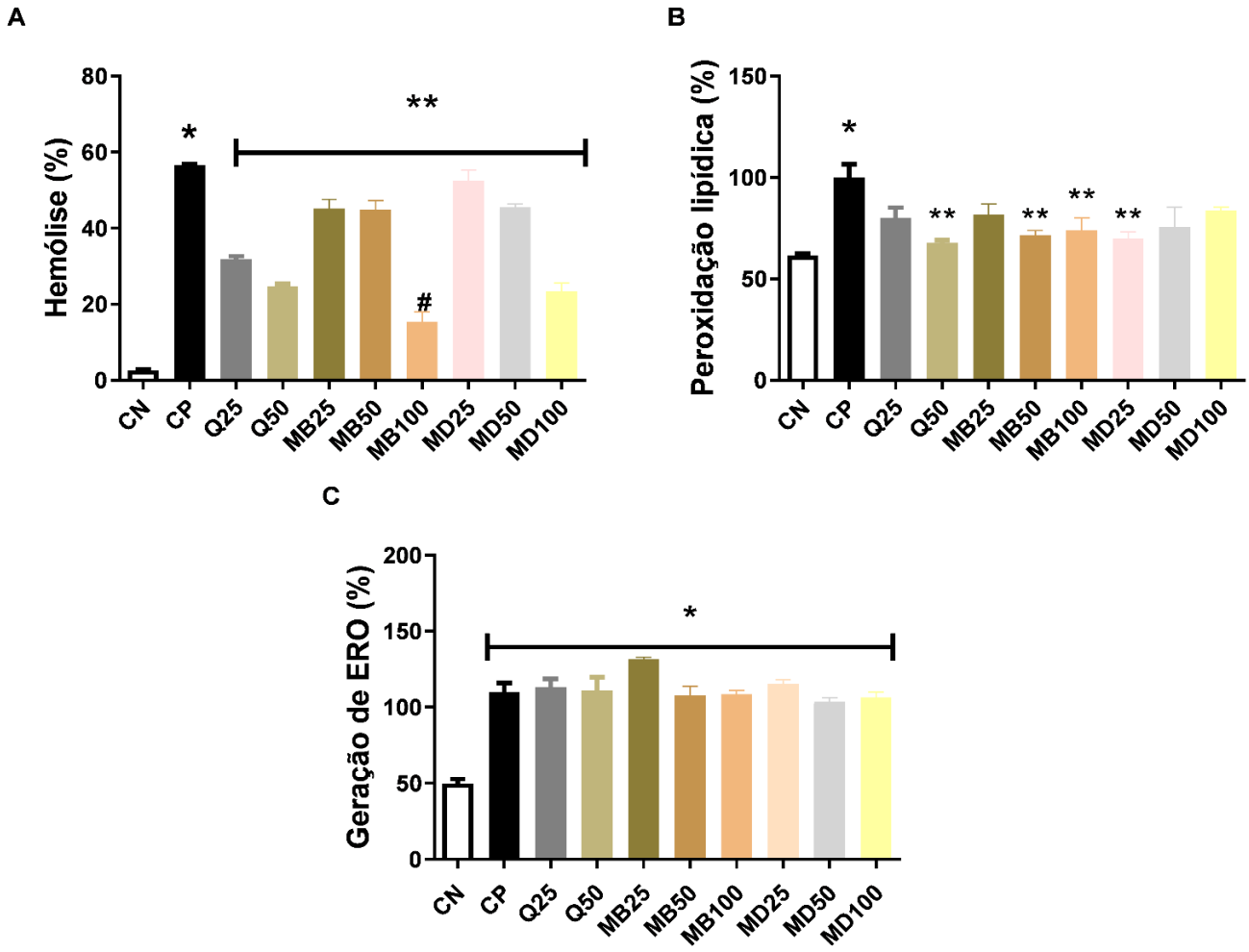
5.1.2 Proteção dos eritrócitos contra a oxidação

Os dados indicam que a exposição dos eritrócitos ao AAPH aumentou a porcentagem de hemólise, peroxidação lipídica e ERO (p< 0,05; Figura 7 A-C). O tratamento nas diferentes doses e em ambas a formas, apresentou diminuição da hemólise, sendo que a minociclina bruta na concentração de 100 µg/mL demonstrou efeitos melhores do que a quercetina (Figura 7 A, p<0,05).

Em relação a peroxidação lipídica observa-se que apenas os tratamentos com quercetina na dose de 50 µg/mL, minociclina bruta nas doses de 50 e 100 µg/mL e minociclina digerida na dose de 25 µg/mL, apresentaram efeitos

protetivos contra a esse dano (Figura 7B, p<0,05). Além disso, não se verifica efeitos do tratamento contra a formação de ERO (p>0,05, Figura 7C).

Figura 7 - Proteção dos eritrócitos contra a oxidação.



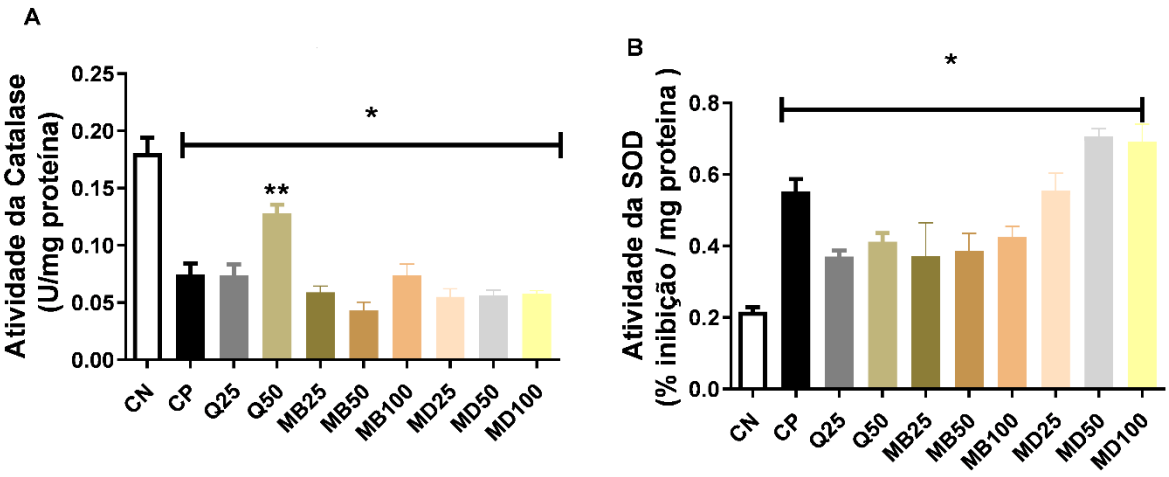
Fonte: Da autora.

Legenda: Atividade da minociclina bruta e digerida sobre a oxidação induzida por AAPH. Análises realizadas em quadruplicata. (A) Porcentagem de hemólise, (B) porcentagem de peroxidação lipídica e (C) porcentagem de geração de ERO. Dados expressos em porcentagem. Teste ANOVA one way, seguido pelo teste Tuckey's post-hoc, p<0,05, *p<0,05 x CN, **p<0,05 x CP e $^{\#}$p<0,05 x Q25 e Q50. CN: controle negativo, CP: controle positivo, Q25: quercetina 25 mg/mL, Q50: quercetina 50 mg/m, MB25: minociclina bruta 25 µg/mL, MB50: minociclina bruta 50 µg/mL, MB100: minociclina bruta 100 µg/mL, MD25: minociclina digerida 25 µg/mL, MD50: minociclina digerida 50 µg/mL, MD100: Minociclina digerida: 100 µg/mL.

5.1.3 Perfil das enzimas antioxidantes

Em relação a atividade das enzimas antioxidantes, observa-se que exposição ao AAPH levou a diminuição da atividade da catalase (Figura 8A) e aumento da atividade da SOD (Figura 8B). No entanto, o tratamento com a minociclina não foi capaz de reverter a diminuição da atividade da catalase, nem o aumento da SOD ($p < 0,05$).

Figura 8 - Atividade das enzimas antioxidantes *in vitro*.



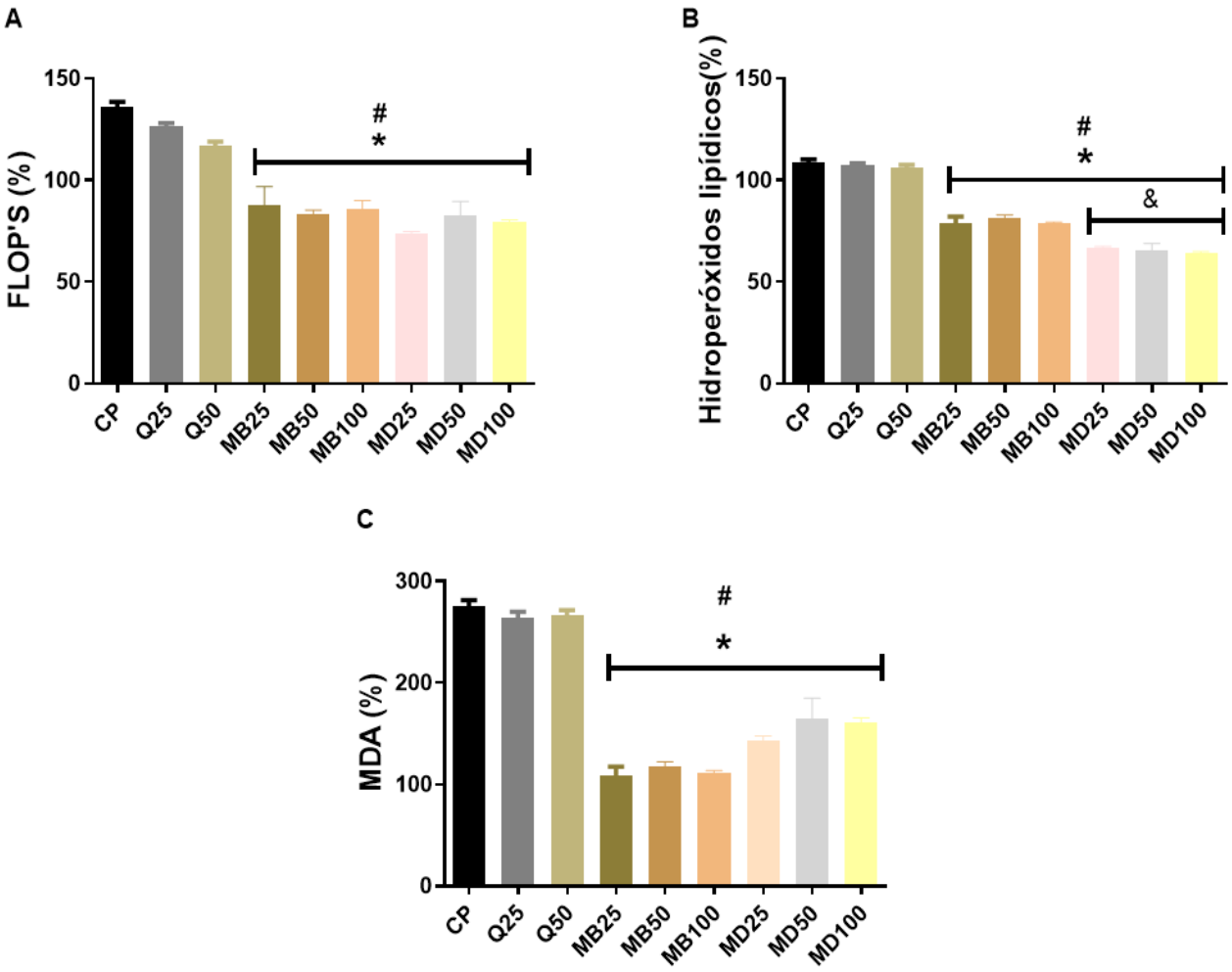
Fonte: Da autora.

Legenda: Atividade da minociclina bruta e digerida sobre a enzimas antioxidantes em modelo de oxidação induzida por AAPH. Análises realizadas em quadruplicata. (A) Atividade da catalase (dados expressos em unidade por miligrama de proteína), (B) atividade da SOD (dados expressos em porcentagem de inibição por miligrama de proteína). Teste ANOVA one way, seguido pelo teste Tuckey's post-hoc, $p<0,05$, *$p<0,05$ x CN, **$p<0,05$ x CP. CN: controle negativo, CP: controle positivo, Q25: quercetina 25 mg/mL, Q50: quercetina 50 mg/m, MB25: minociclina bruta 25 µg/mL, MB50: minociclina bruta 50 µg/mL, MB100: minociclina bruta 100 µg/mL, MD25: minociclina digerida 25 µg/mL, MD50: minociclina digerida 50 µg/mL, MD100: Minociclina digerida: 100 µg/mL.

5.1.4 Proteção contra a oxidação plasmática

Observa-se na Figura 9 A-C que a minociclina apresentou resultados melhores do que a quercetina contra a formação de FIOP's, de hidroperóxidos lipídicos e MDA ($p<0,05$). Ademais, a minociclina digerida em ambas as doses levou uma maior proteção contra a formação e hidroperóxidos lipídicos em comparação com a sua forma bruta ($p<0,05$.)

Figura 9 - Proteção contra a oxidação plasmática.



Fonte: Da autora.

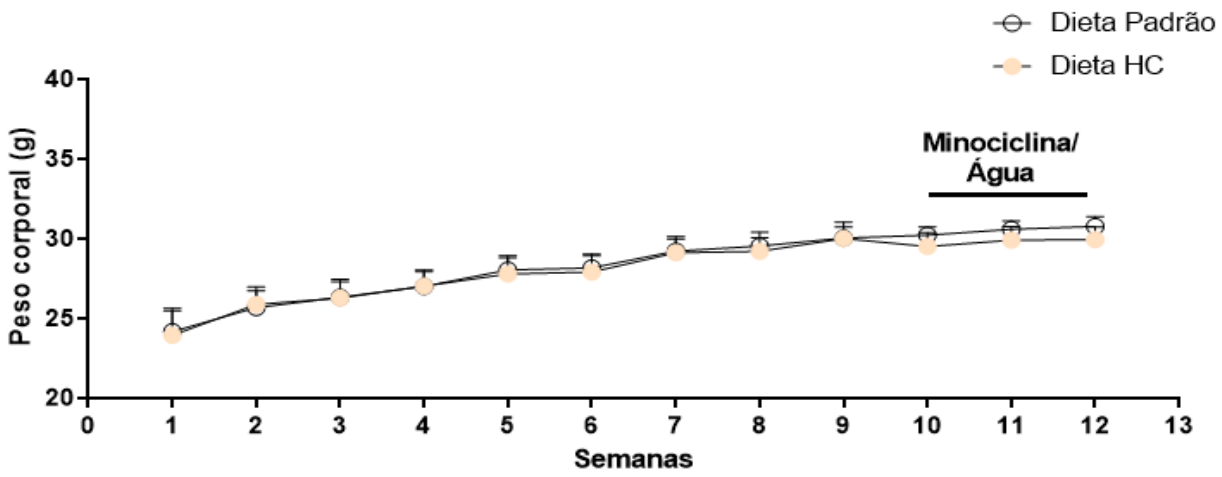
Legenda: Atividade da minociclina bruta e digerida contra a oxidação plasmática. Análises realizadas em sextruplicata. (A) Porcentagem FLOP's total, (B) porcentagem de hidroperóxidos lipídicos, (C) porcentagem MDA. Dados expressos em porcentagem. Teste ANOVA one way, seguido pelo teste Tuckey's post-hoc, $p<0,05$, *$p<0,05$ x CP, $^{\#}p<0,05$ x Q25 e Q50, $^{\&}p<0,05$ x MB 25, MB50 e MB100. CN: controle negativo, CP: controle positivo, Q25: quercetina 25 mg/mL, Q50: quercetina 50 mg/m, MB25: minociclina bruta 25 µg/mL, MB50: minociclina bruta 50 µg/mL, MB100: minociclina bruta 100 µg/mL, MD25: minociclina digerida 25 µg/mL, MD50: minociclina digerida 50 µg/mL, MD100: Minociclina digerida: 100 µg/mL.

5.2 ENSAIOS *IN VIVO*

5.2.1 Evolução ponderal

Na Figura 10, observa-se a evolução do peso corporal dos animais (em gramas) durante as 12 semanas de dieta padrão e dieta HC. Não foram encontradas alterações no peso corporal entre os grupos (p>0,05). Ainda, a administração de minociclina ou água da 10° a 12° semana, não afetaram o peso corporal dos animais (p>0,05).

Figura 10 - Evolução ponderal e efeitos da minociclina sob o peso (em gramas).



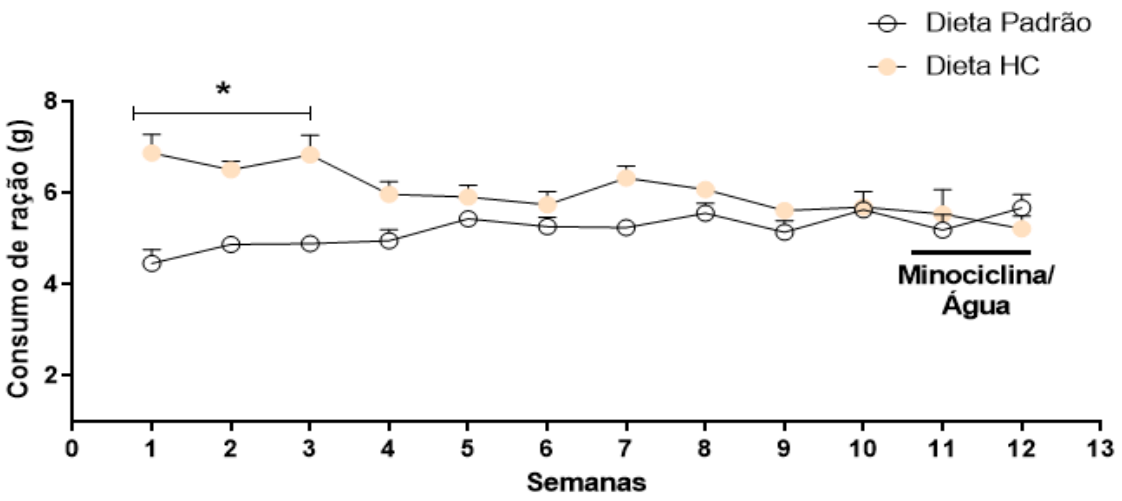
Fonte: Da autora.

Legenda: Evolução do peso corporal de camundongos Balb/C machos, expostos ou não a dieta HC por um período de 12 semanas, que receberam minociclina (50 mg/Kg) ou água na mesma proporção na 10° e 12° semana, n=6/grupo, dados expressos em grama (g). Teste *ANOVA two way*, seguido pelo teste *Tuckey's post-hoc*. HC: dieta rica em carboidratos refinados.

5.2.2 Consumo de ração

Na Figura 11, podemos observar o consumo de ração (em gramas) durante as 12 semanas de dieta padrão ou dieta HC, com a administração de minociclina ou água na 10° e 12° semana. Nas primeiras semanas houve um maior consumo de dieta HC em relação a dieta padrão (p<0,05), sendo que não há diferença significativa após a 4° semana de dieta.

Figura 11- Consumo de ração diário e sobre a influência da administração de água ou minociclina (em gramas).



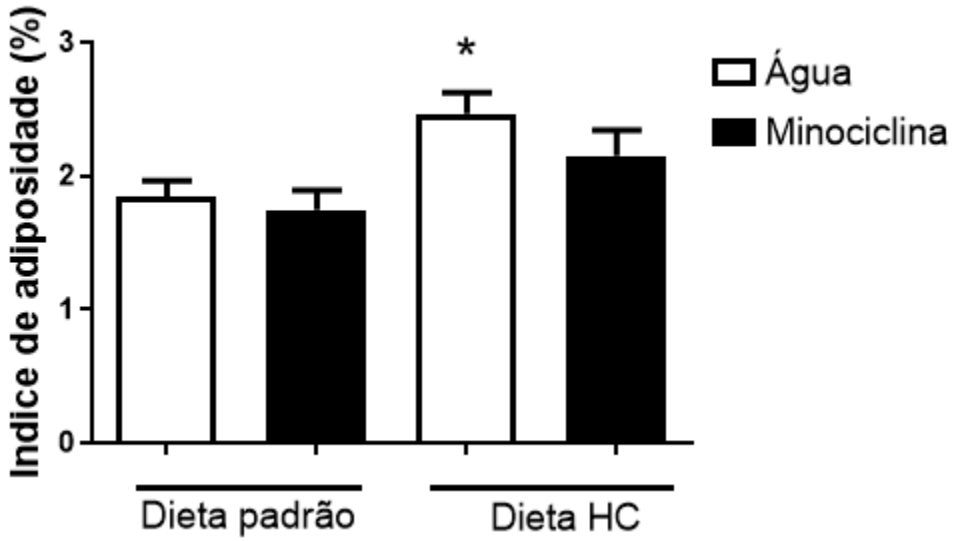
Fonte: Da autora.

Legenda: Consumo de ração de camundongos Balb/C machos, expostos ou não a dieta HC por um período de 12 semanas, que receberam minociclina (50 mg/Kg) ou água na mesma proporção na 10° e 12° semana, n= 6/grupo, dados expressos em grama (g). Teste *ANOVA two way*, seguido pelo teste *Tuckey's post-hoc*. *p<0,05 x dieta padrão. HC: dieta rica em carboidratos refinados.

5.2.3 Índice de adiposidade

Em relação a adiposidade, a Figura 12 revela que os animais que receberam dieta HC tiveram um aumento da adiposidade em relação ao grupo dieta padrão (p<0,05) e o tratamento não reverteu essa alteração (p> 0,05).

Figura 12 - Índice de adiposidade (%).



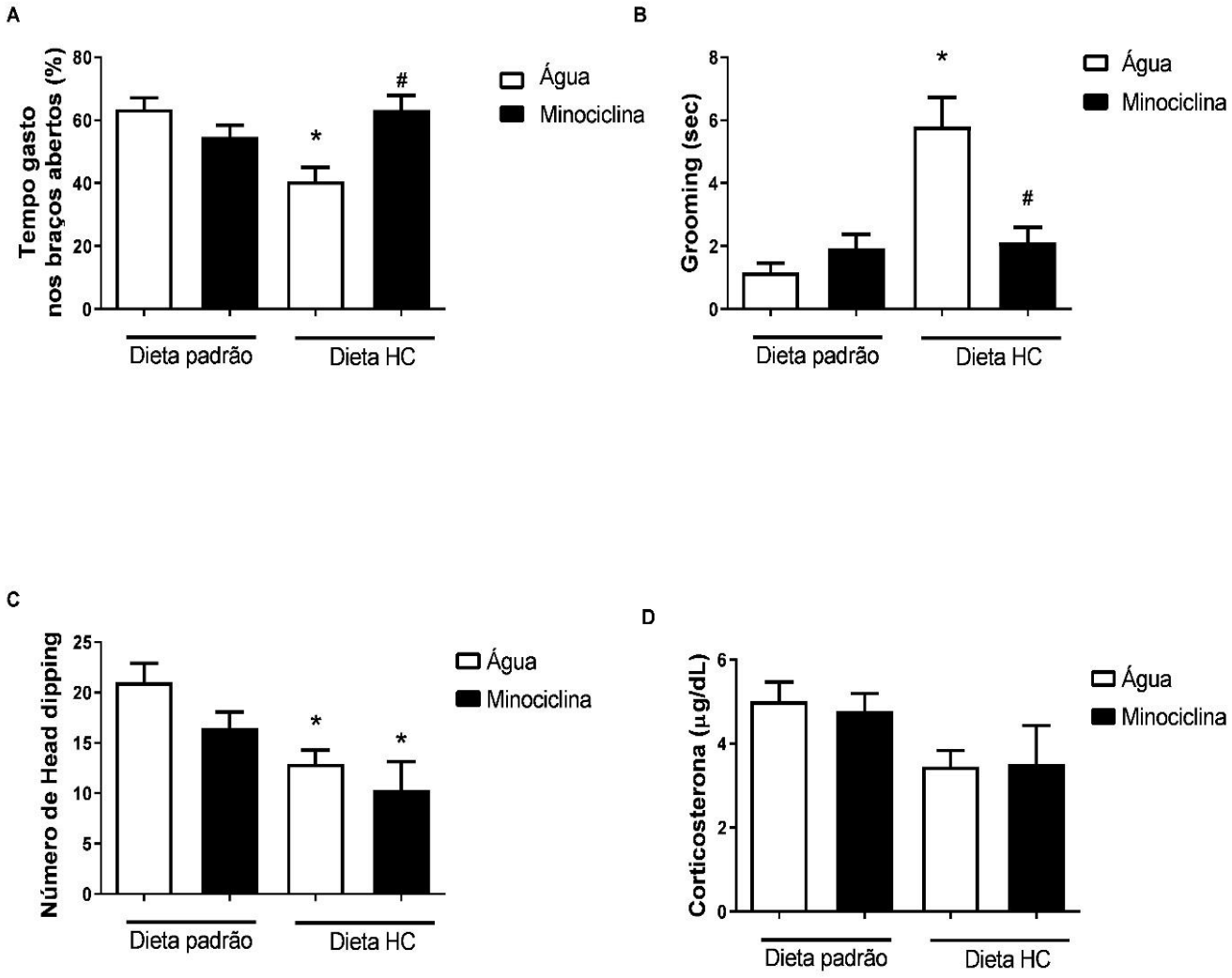
Fonte: Da autora.

Legenda: Índice de adiposidade de camundongos Balb/C machos, expostos ou não a dieta HC por um período de 12 semanas, que receberam minociclina, n= 13-16/grupo, dados expressos em porcentagem. Teste *ANOVA two way*, seguido pelo teste *Tuckey's post-hoc*. *p<0,05 x dieta padrão. HC: dieta rica em carboidratos refinados.

5.2.4 Avaliação comportamental e níveis de corticosterona

No teste de LCE, avaliou-se a permanência dos camundongos nos braços abertos, tempo de *grooming* e número de *head dipping*. Observa-se que a dieta levou a uma diminuição da permanência dos animais nos braços aberto (Figura 13A) e do número de *head dipping* (Figura 13C), além do aumento do tempo de *grooming* (Figura 12B) (p<0,05). O tratamento com a minociclina foi capaz de reverter a diminuição da permanência dos animais nos braços abertos e o aumento de *grooming* (p<0,05). Porém, não se verifica alterações nos níveis de corticosterona pela dieta ou tratamento (Figura 13D, p>0,05).

Figura 13 - Avaliação comportamental e níveis de corticosterona.



Fonte: Da autora.

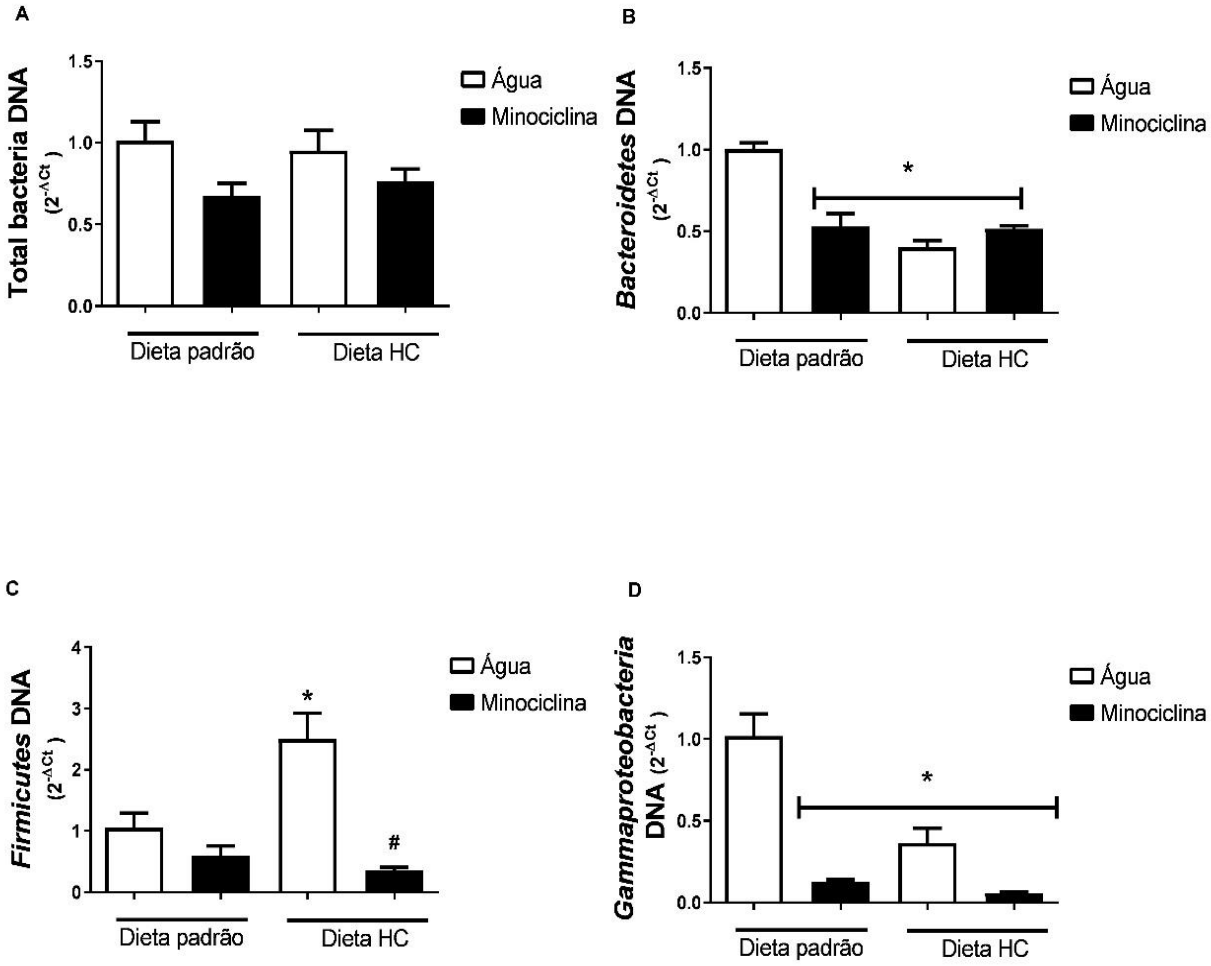
Legenda: Avaliação comportamental e níveis de corticosterona de camundongos Balb/C machos, expostos ou não a dieta HC por um período de 12 semanas, que receberam minociclina (50 mg/Kg) ou água na mesma proporção na 10° e 12° semana. (A) Tempo gasto nos braços abertos (n= 14-17/grupo, dados expressos em porcentagem), (B) tempo de *grooming* (n= 9-14/grupo, dados expressos em segundos), (C) número de *head dipping* (n= 9-13/grupo, dados expressos em número absoluto), (D) níveis de corticosterona (n= 6-8/grupo, dados expressos em µg/dL). Teste *ANOVA two way*, seguido pelo teste *Tuckey's post-hoc*. *p<0,05 x dieta padrão, #p<0,05 x dieta HC. HC: dieta rica em carboidratos refinados.

5.2.5 qPCR dos filos bacterianos da microbiota fecal

Ao realizar o qPCR do conteúdo fecal, observa-se que tanto a dieta, como a minociclina, não alteraram a quantidade de bactérias totais (p>0,05). Porém, a

dieta aumentou *Firmicutes* e diminuiu *Bacteroidetes* e *Gammaproteobacterias* (p<0,05). A minociclina foi capaz de reverter o aumento de *Firmicutes* (p<0,05).

Figura 14 - qPCR dos filos bacterianos da microbiota fecal.



Fonte: Da autora.

Legenda: qPCR dos filos bacterianos da microbiota fecal de camundongos Balb/C machos, expostos ou não a dieta HC por um período de 12 semanas, que receberam minociclina (50 mg/Kg) ou água na mesma proporção na 10° e 12° semana. (A) Total Bactérias, (B) *Bacteroidetes*, (C) *Firmicutes*, (D) *Gammaproteobactéria*, n= 2-3/grupo (pool), dados expressos em $2^{-\Delta Ct}$. Teste *ANOVA two way*, seguido pelo teste *Tuckey's post-hoc*. *p<0,05 x dieta padrão, $^{\#}$p<0,05 x dieta HC. HC: dieta rica em carboidratos refinados.

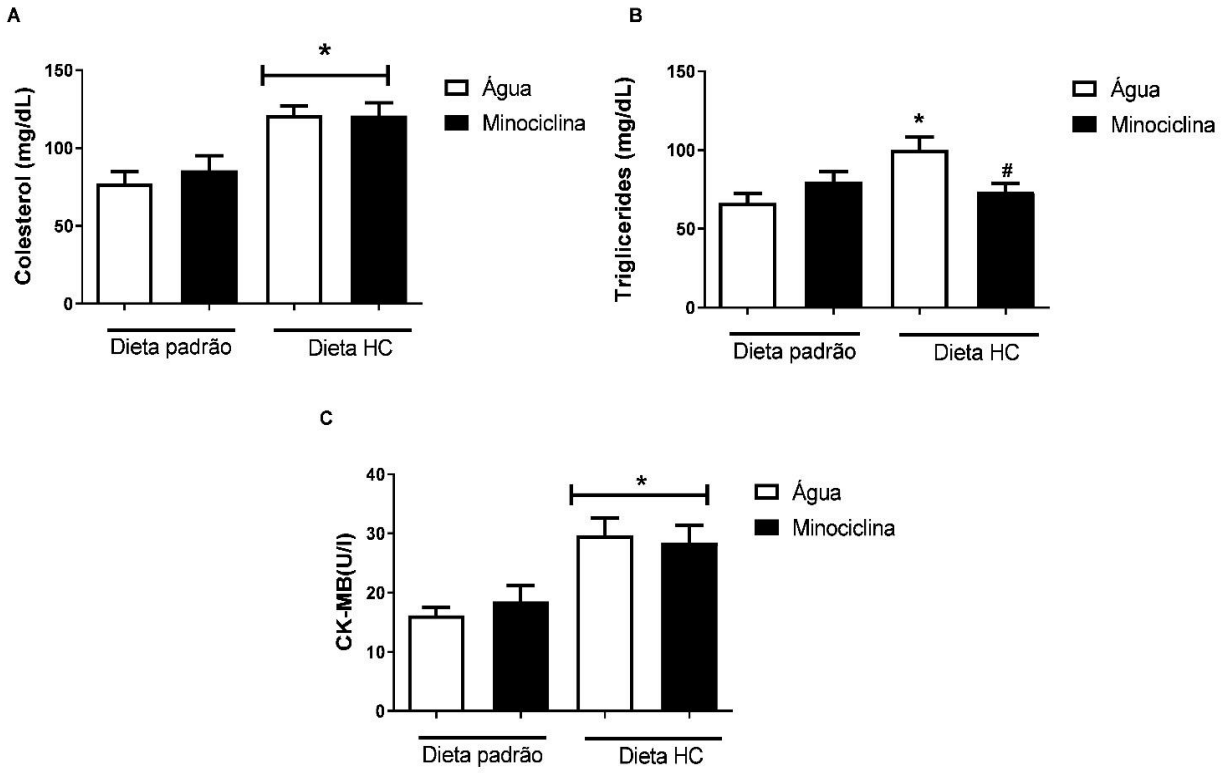
5.2.6 Determinação de parâmetros bioquímicos

Ao avaliar os níveis de colesterol e triglicérides (Figura 15A e 15B), verifica-se, que os animais que receberam dieta HC tiveram aumento dos seus

níveis em relação ao grupo dieta padrão (p<0,05) e o tratamento com a minociclina reverteu apenas os níveis de triglicérides (p>0,05).

Além disso, a função cardíaca foi determinada pela atividade da CK-MB (Figura 15C). Observamos que a dieta HC aumenta a atividade da CK-MB (p<0,05), e o tratamento com a minociclina atua contra essa alteração (p>0,05).

Figura 15 - Parâmetros bioquímicos.



Fonte: Da autora.

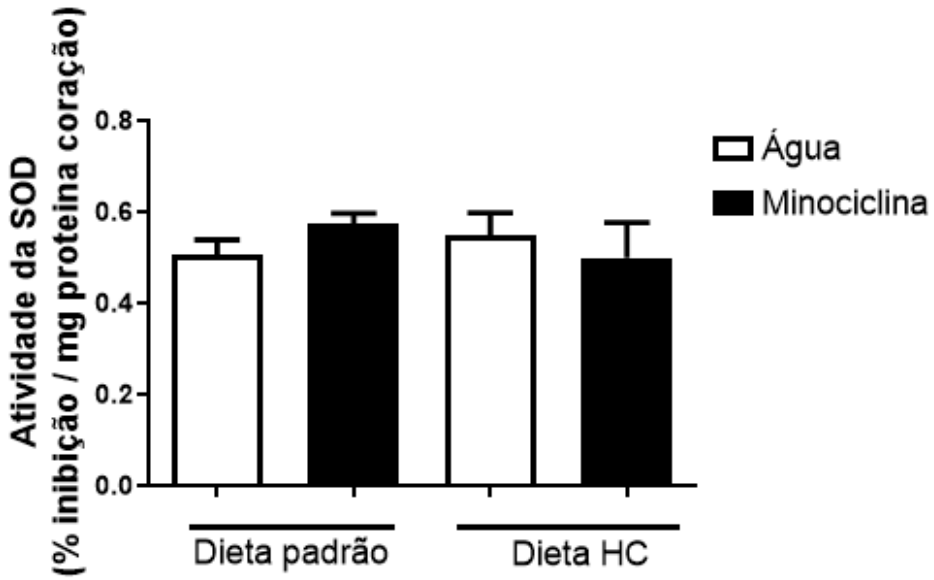
Legenda: Parâmetros bioquímicos de camundongos Balb/C machos, expostos ou não a dieta HC por um período de 12 semanas, que receberam minociclina (50 mg/Kg) ou água na mesma proporção na 10° e 12° semana. (A) Níveis plasmáticos de colesterol (n= 8-14/grupo, dados expressos em miligrama por decilitro), (B) níveis plasmáticos de triglicérides (n= 10-13/grupo, dados expressos em miligrama por decilitro), (C) atividade plasmática de CK-MB (n= 9-12/grupo, dados expressos em unidade por litro). Teste *ANOVA two way*, seguido pelo teste *Tuckey's post-hoc*. *p<0,05 x dieta padrão, #p<0,05 x dieta HC. HC: dieta rica em carboidratos refinados.

5.2.7 Atividade da SOD, Catalase e GPx

A Figura 16 mostra que a dieta HC não levou a alterações da atividade da SOD no tecido cardíaco (p>0,05). Em relação a atividade da catalase (Figura 17)

e da GPx (Figura 18), verifica-se que a dieta HC levou um aumento da atividade dessas enzimas, e o tratamento com minociclina reverteu essas alterações ($p<0,05$).

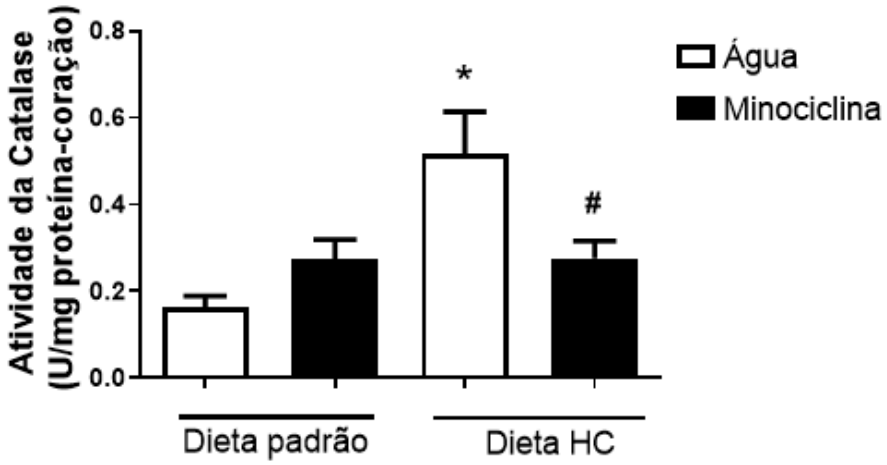
Figura 16 - Atividade da SOD.



Fonte: Da autora.

Legenda: Atividade da SOD de Camundongos Balb/C machos, expostos ou não a dieta HC por um período de 12 semanas, que receberam minociclina (50 mg/Kg) ou água na mesma proporção na 10° e 12° semana, n= 10-12/grupo, dados expressos em porcentagem de inibição por miligrama de proteína cardíaca. Teste *ANOVA two way*, seguido pelo teste *Tuckey's post-hoc.* HC: dieta rica em carboidratos refinados.

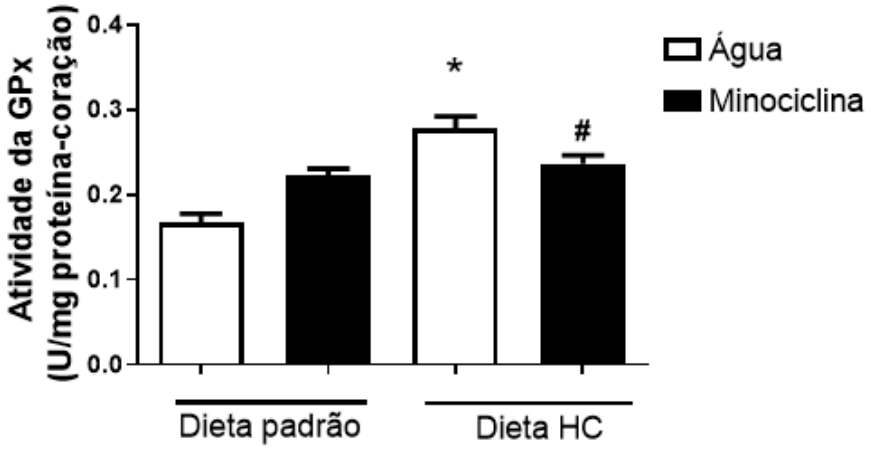
Figura 17 - Atividade da catalase.



Fonte: Da autora.

Legenda: Atividade da Catalase de camundongos Balb/C machos, expostos ou não a dieta HC por um período de 12 semanas, que receberam minociclina (50 mg/Kg) ou água na mesma proporção na 10° e 12° semana, n= 11-14/grupo, dados expressos em unidade por miligrama de proteína cardíaca. Teste *ANOVA two way*, seguido pelo teste *Tuckey's post-hoc*. *p<0,05 x dieta padrão, #p<0,05 x dieta HC. HC: dieta rica em carboidratos refinados.

Figura 18 - Atividade da GPx.



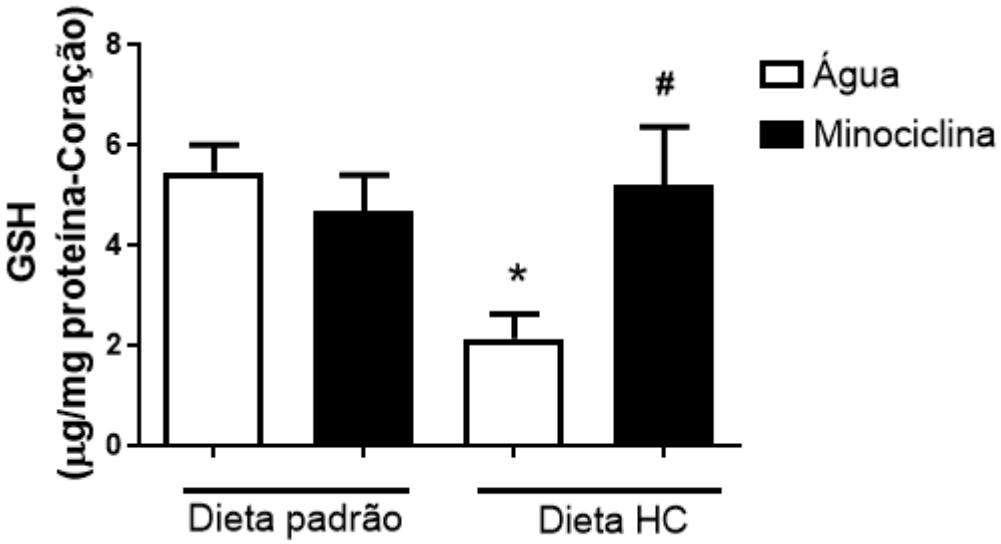
Fonte: Da autora.

Legenda: Atividade da GPx de camundongos Balb/C machos, expostos ou não a dieta HC por um período de 12 semanas, que receberam minociclina (50 mg/Kg) ou água na mesma proporção na 10° e 12° semana, n= 6-7/grupo, dados expressos em unidade por miligrama de proteína cardíaca. Teste *ANOVA two way*, seguido pelo teste *Tuckey's post-hoc*. *p<0,05 x dieta padrão, #p<0,05 x dieta HC. HC: dieta rica em carboidratos refinados.

5.2.8 Níveis de GSH

A Figura 19, mostra os níveis cardíacos de GSH. Observa-se que os animais submetidos a dieta HC tiverem diminuição dos níveis de GSH e o tratamento com a minociclina foi capaz de reverteu essa alteração ($p<0,05$).

Figura 19 - Níveis de GSH.



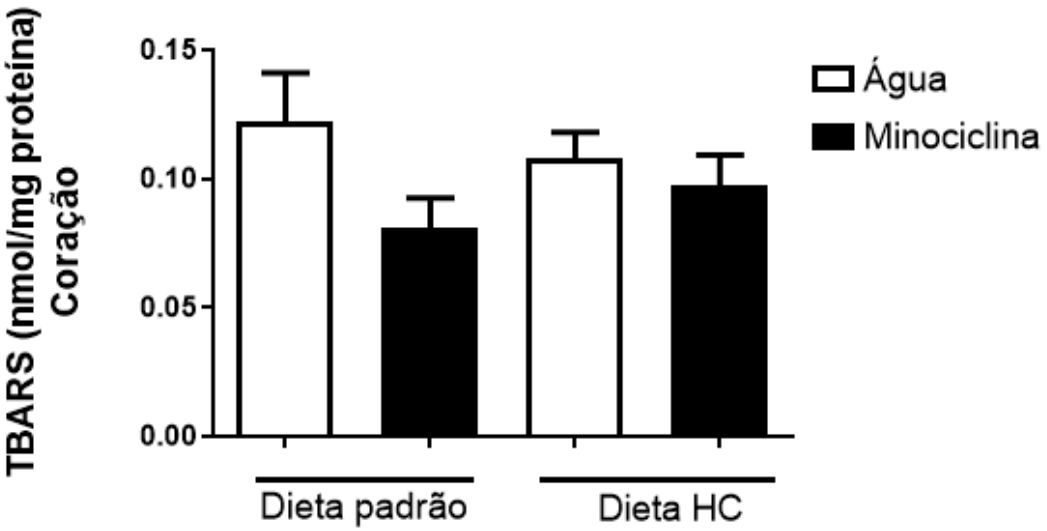
Fonte: Da autora.

Legenda: Níveis de GSH de camundongos Balb/C machos, expostos ou não a dieta HC por um período de 12 semanas, que receberam minociclina (50 mg/Kg) ou água na mesma proporção na 10° e 12° semana, n= 11-12/grupo, dados expressos em microgramas por miligrama de proteína cardíaca. Teste *ANOVA two way*, seguido pelo teste *Tuckey's post-hoc*. *$p<0,05$ x dieta padrão, $^{\#}p<0,05$ x dieta HC. HC: dieta rica em carboidratos refinados.

5.2.9 Determinação dos níveis de TBARS

Ao avaliar os níveis de TBARS (Figura 20) no tecido cardíaco, não foi possível verificar alterações causadas pela dieta ou tratamento ($p>0,05$).

Figura 20 - Níveis de TBARS.



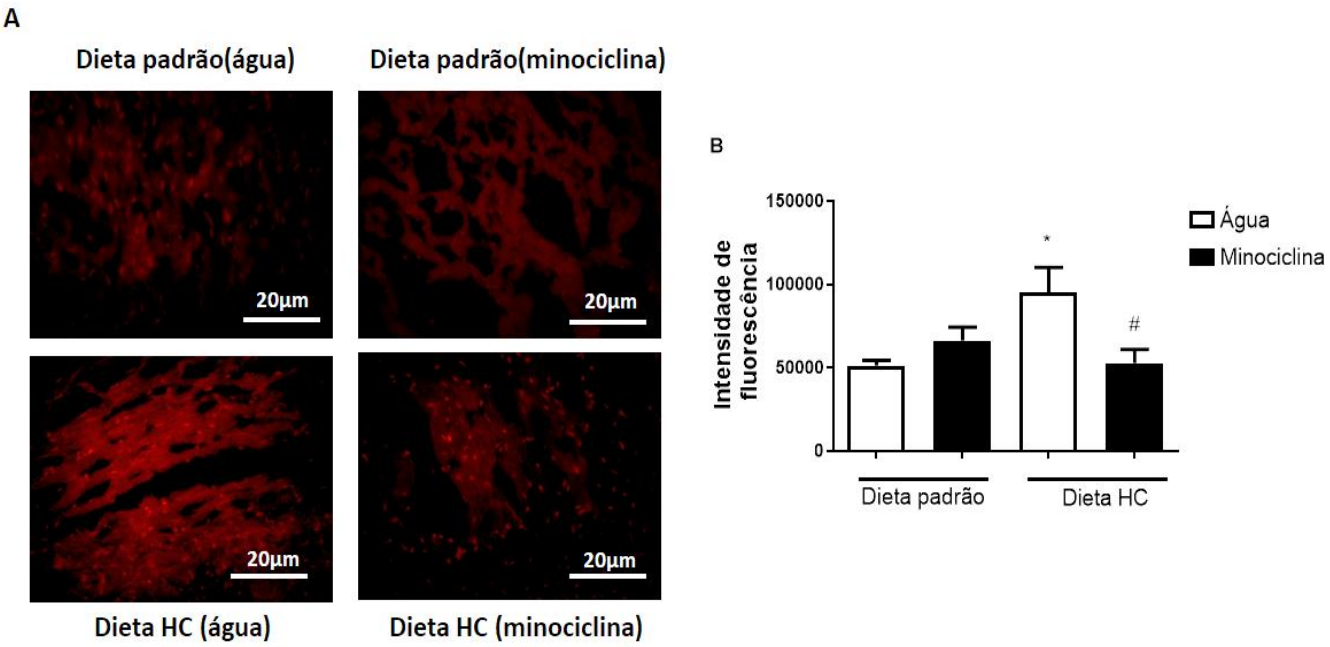
Fonte: Da autora.

Legenda: Níveis de TBARS de camundongos Balb/C machos, expostos ou não a dieta HC por um período de 12 semanas, que receberam minociclina (50 mg/Kg) ou água na mesma proporção na 10° e 12° semana, n= 9-11/grupo, dados expressos em nanomolar por miligrama de proteína cardíaca. Teste *ANOVA two way*, seguido pelo teste *Tuckey's post-hoc*. p>0,05. HC: dieta rica em carboidratos refinados.

5.2.10 Determinação de ERO *in situ*

Observa-se que os animais submetidos a dieta HC tiveram aumento dos níveis de ERO *in situ* e o tratamento com a minociclina foi capaz de reverter esse dano (Figura 21, p<0,05).

Figura 21 - Determinação de ERO *in situ.*



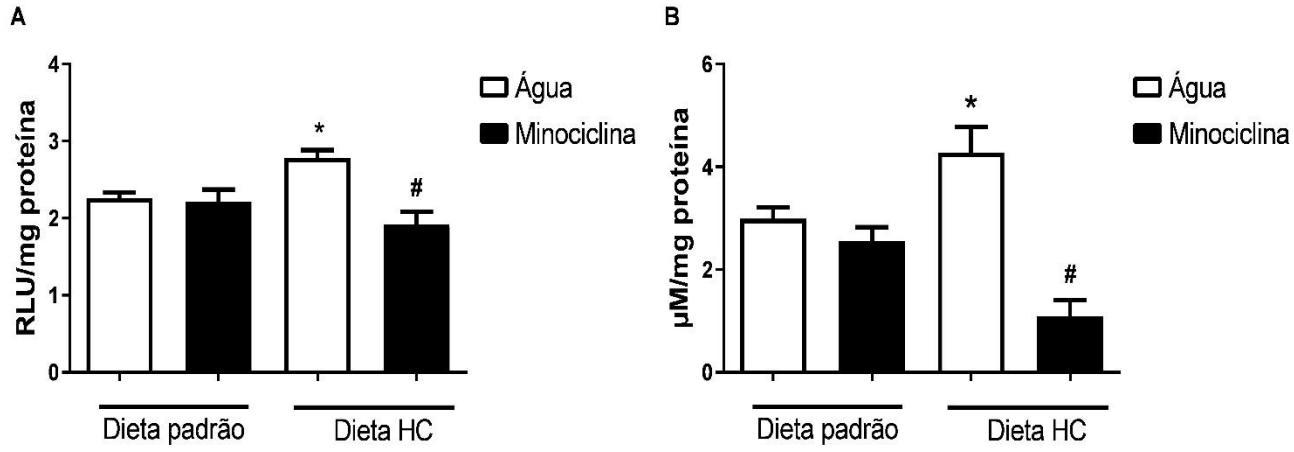
Fonte: Da autora.

Legenda: Avaliação dos níveis de ERO *in situ* por DHE. Camundongos Balb/C machos, expostos ou não a dieta HC por um período de 12 semanas, que receberam minociclina (50 mg/Kg) ou água na mesma proporção na 10° e 12° semana. (A) Fotografias representativas do tecido cardíaco (400x) incubados com DHE (10^{-3} M), (B) representação gráfica da intensidade de fluorescência vermelhas dos produtos da reação do DHE com O_2^- (n= 4/grupo, dados expressos como média ± E.P.M.). Teste *ANOVA two way*, seguido pelo teste *Tuckey's post-hoc*. *p<0,05 x dieta padrão, #p<0,05 x dieta HC. HC: dieta rica em carboidratos refinados.

5.2.11 Determinação de O_2^- e H_2O_2

Observa-se na Figura 22 A-B que a dieta levou a um aumento de O^{2-} e H_2O_2.O tratamento com a minociclina reverteu essas alterações (p<0,05).

Figura 22 - Determinação de O_2^- e H_2O_2.



Fonte: Da autora.

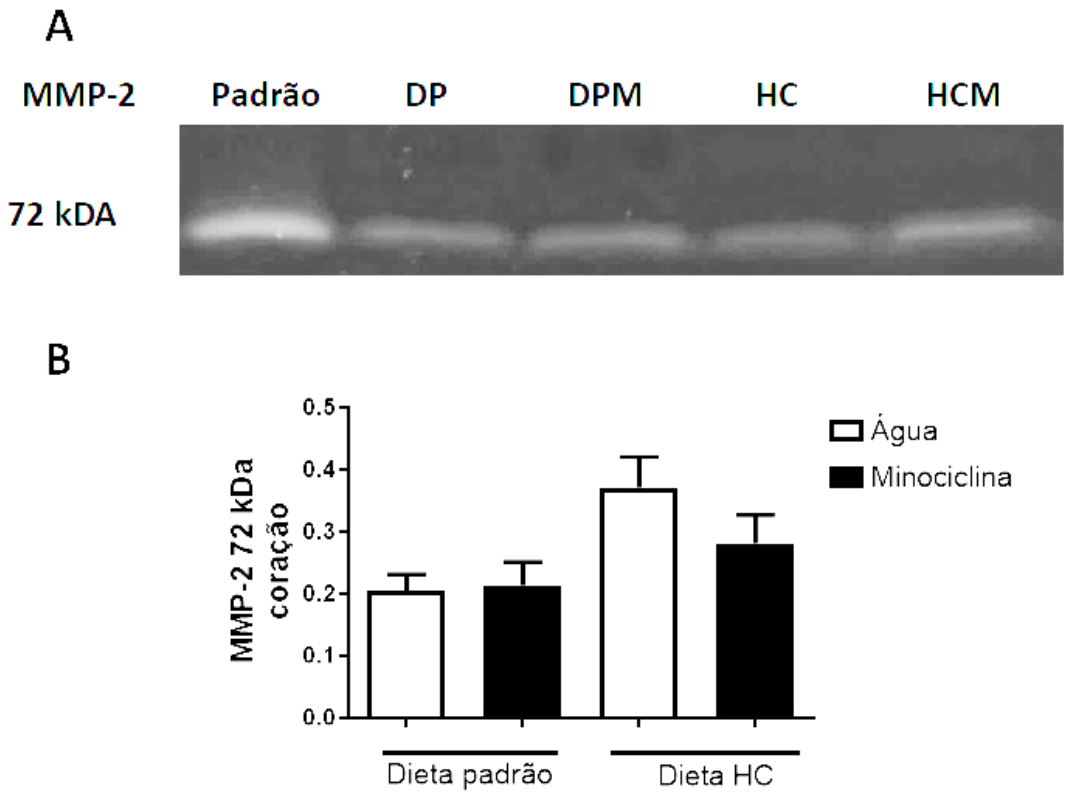
Legenda: Camundongos Balb/C machos, expostos ou não a dieta HC por um período de 12 semanas, que receberam minociclina (50 mg/Kg) ou água na mesma proporção na 10° e 12° semana. (A) Determinação de O_2^- (n= 11-12/grupo, dados expressos em unidades relativas de luz por proteína cardíaca), (B) determinação de H_2O_2 (n= 6-8/grupo, dados expressos em µmol H_2O_2 / mg de proteína cardíaca). Teste *ANOVA two way*, seguido pelo teste *Tuckey's post-hoc*. *p<0,05 x dieta padrão, #p<0,05 x dieta HC. HC: dieta rica em carboidratos refinados.

5.2.12 Zimografia em gel

Na Figura 23B, encontra-se a determinação de MMP-2 no tecido cardíaco. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados (p>0,05).

Em relação a MMP-9 (Figura 24B), os resultados indicam um aumento dos seus níveis no grupo dieta HC em relação ao grupo dieta padrão (p<0,05) e o tratamento com a minociclina não foi capaz de reverter esse dano (p>0,05).

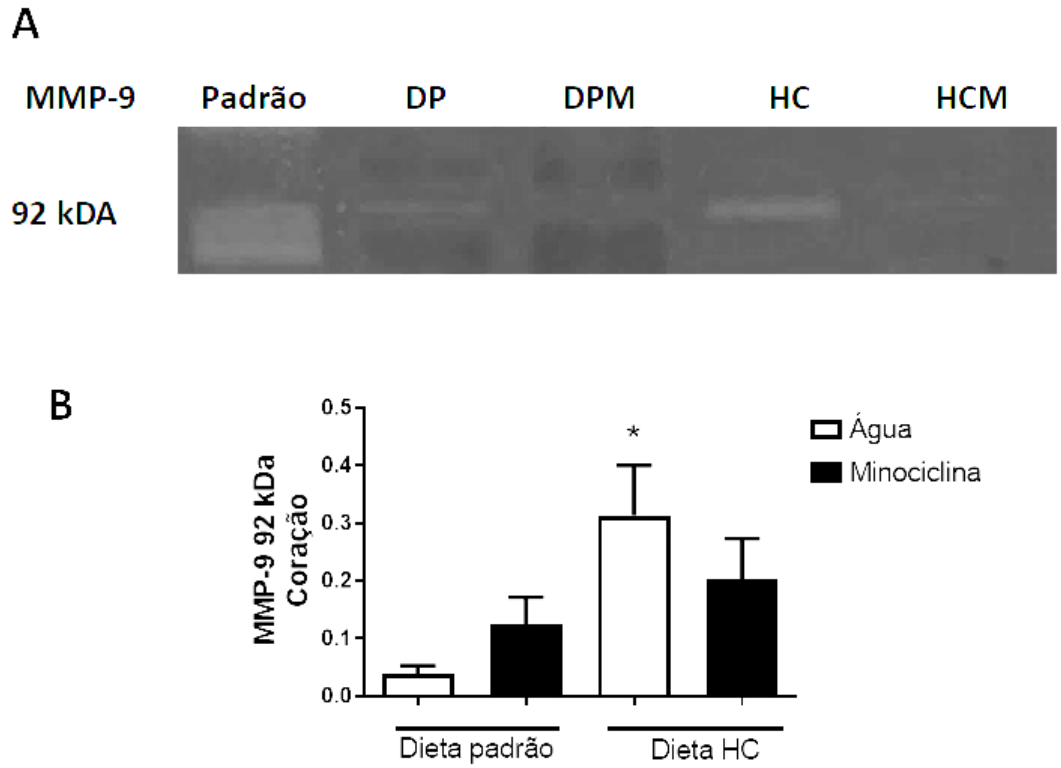
Figura 23 - Níveis de MMP-2 por zimografia.



Fonte: Da autora.

Legenda: Camundongos Balb/C machos, expostos ou não a dieta HC por um período de 12 semanas, que receberam minociclina (50 mg/Kg) ou água na mesma proporção na 10° e 12° semana. (A) Gel representativo, em escala cinza, do zimograma de extratos cardíacos para MMP-2, (B) representação gráfica (n= 14-17/grupo, dados expressos como média ± E.P.M.). Teste *ANOVA two way*, seguido pelo teste *Tuckey's post-hoc*. p>0,05. HC: dieta rica em carboidratos refinados.

Figura 24 - Níveis de MMP-9 por zimografia.



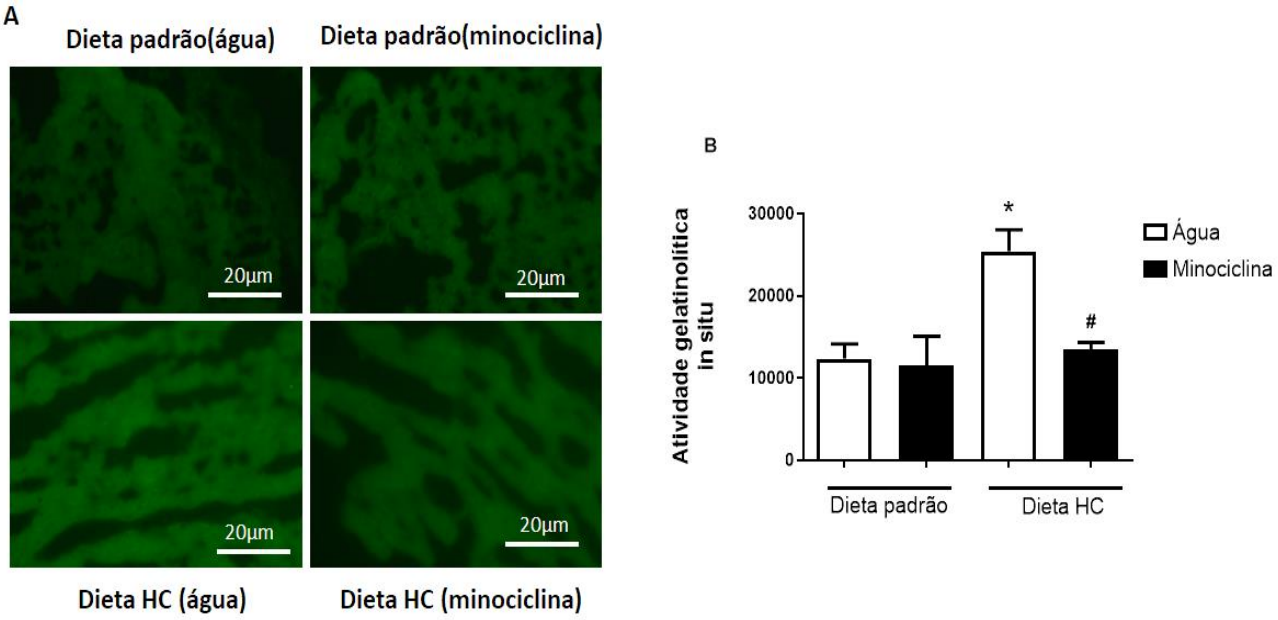
Fonte: Da autora.

Legenda: Camundongos Balb/C machos, expostos ou não a dieta HC por um período de 12 semanas, que receberam minociclina (50 mg/Kg) ou água na mesma proporção na 10° e 12° semana. (A) Gel representativo, em escala cinza, do zimograma de extratos cardíacos para MMP-9, (B) representação gráfica (n= 14-17/grupo, dados expressos como média ± E.P.M.). Teste *ANOVA two way*, seguido pelo teste *Tuckey's post-hoc*. *p<0,05 x dieta padrão. HC: dieta rica em carboidratos refinados.

5.2.13 Zimografia *in situ*

Na Figura 25A, observamos a representação gráfica da atividade de MMPs no extrato de coração através da atividade gelatinolítica *in situ*. Os dados indicam aumento da atividade nos grupos dieta HC em relação ao grupo dieta padrão ($p<0,05$) e o tratamento com minociclina foi capaz de reverter essa alteração ($p<0,05$).

Figura 25 - Atividade gelatinolítica *in situ*.



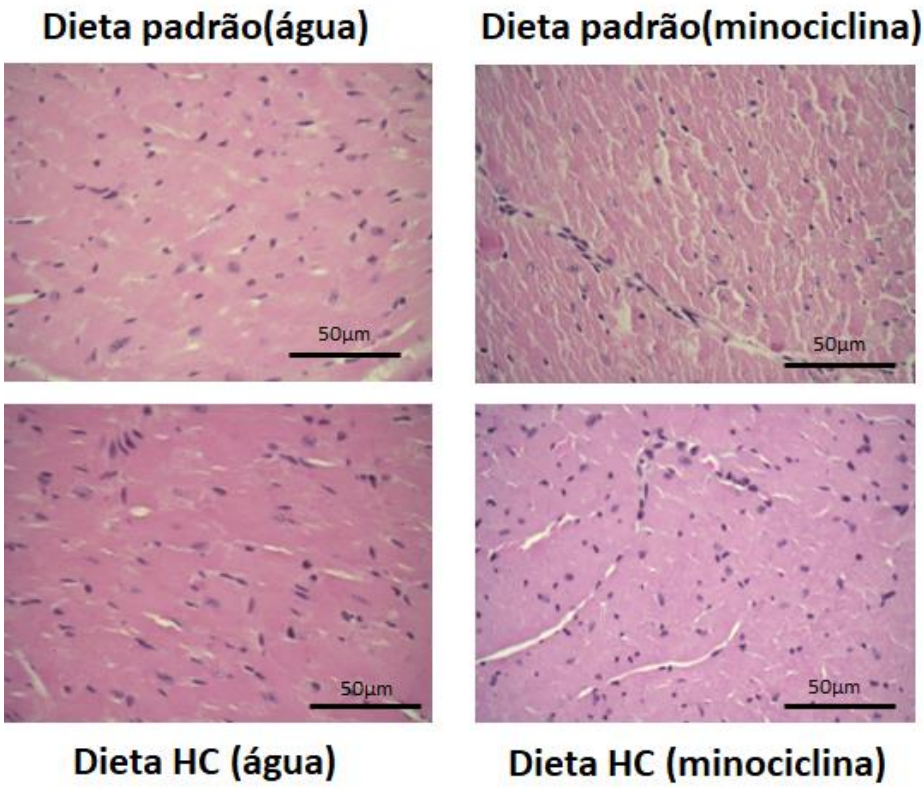
Fonte: Da autora.

Legenda: Camundongos Balb/C machos, expostos ou não a dieta HC por um período de 12 semanas, que receberam minociclina (50 mg/Kg) ou água na mesma proporção na 10° e 12° semana. (A) Fotografias representativas do tecido cardíaco (400x) incubados com Dq Gelatina (1 µL/mL), (B) representação gráfica da atividade gelatinolítica *in situ*, em que a intensidade de fluorescência verde reflete a atividade enzimática via degradação da gelatina (n= 3-4/grupo, dados expressos como média ± E.P.M.). Teste *ANOVA two way*, seguido pelo teste *Tuckey's post-hoc*. *p<0,05 x dieta padrão, $^{\#}$p<0,05 x dieta HC. HC: dieta rica em carboidratos refinados.

5.2.14 Infiltrado inflamatório e colágeno

Observa-se ausência de infiltrados inflamatórios nos tecidos cardíacos dos animais estudados (Figura 26). No entanto, é possível verificar um aumento da % de colágeno no grupo que recebeu dieta HC (Figura 27 B, p<0,05) e o tratamento com a minociclina foi capaz de reverter essa alteração (p<0,05).

Figura 26 - Infiltrado inflamatório.

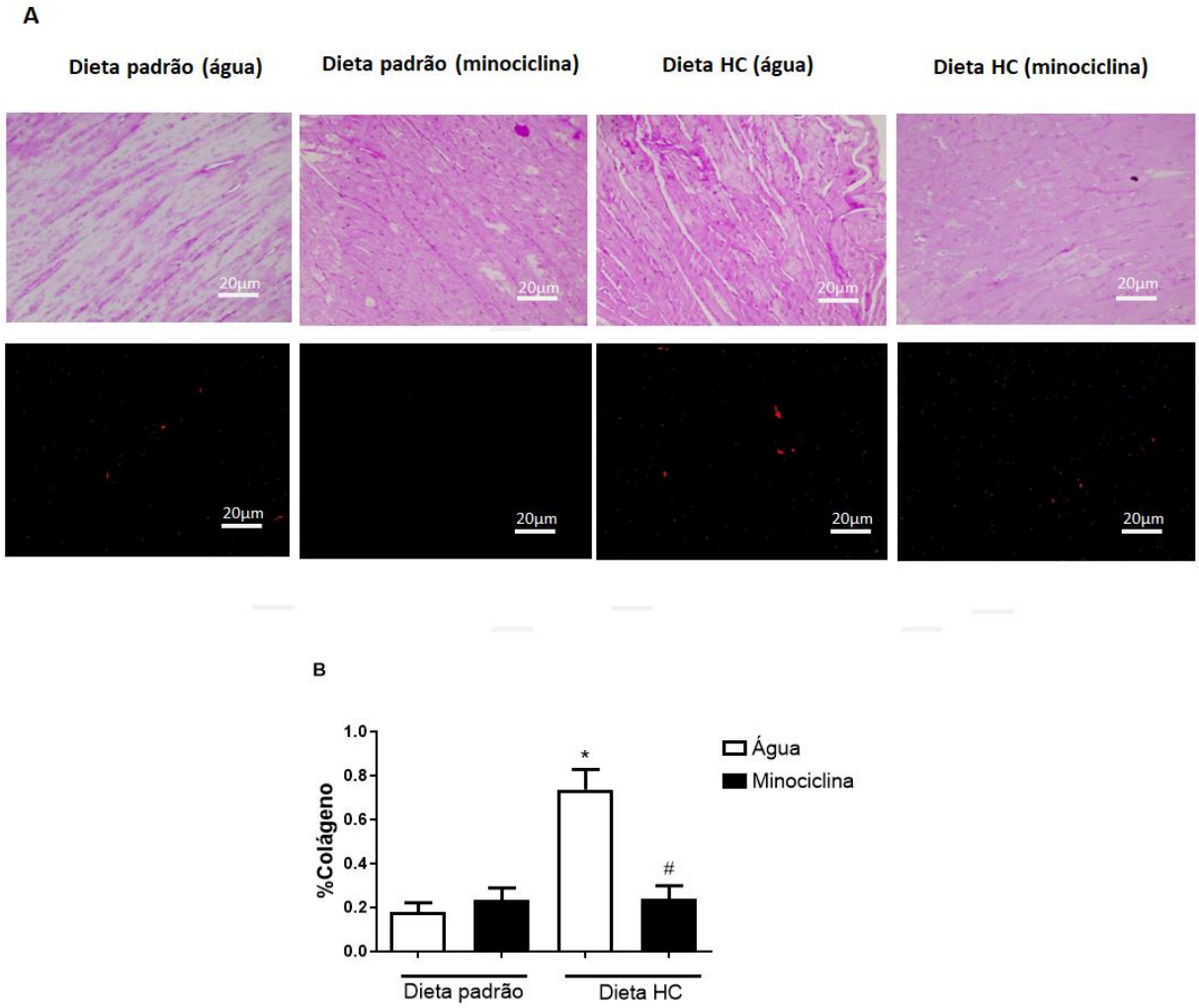


Fonte: Da autora.

Legenda: Camundongos Balb/C machos, expostos ou não a dieta HC por um período de 12 semanas, que receberam minociclina (50 mg/Kg) ou água na mesma proporção na 10° e 12° semana. Fotografias representativas do tecido cardíaco (400x) corados com hematoxilina e eosina ($p>0,05$, n= 4 a 6/grupo). HC: dieta rica em carboidratos refinados

.

Figura 27 - Porcentagem de colágeno.



Fonte: Da autora.

Legenda: Camundongos Balb/C machos, expostos ou não a dieta HC por um período de 12 semanas, que receberam minociclina (50 mg/Kg) ou água na mesma proporção na 10° e 12° semana. (A) Fotografias representativas do tecido cardíaco (200x) corados com *Picro Sirius red,* realizadas no campo claro e à luz polarizada. Zoom de 100% nos pontos onde houve marcação de colágeno, (B) representação gráfica da porcentagem de colágeno intersticial (n= 4-6/grupo, dados expressos como média ± E.P.M.) Teste *ANOVA two way*, seguido pelo teste *Tuckey's post-hoc*. *p<0,05 x dieta padrão, #p<0,05 x dieta HC. HC: dieta rica em carboidratos refinados.

6 DISCUSSÃO

Conforme escrito anteriormente, o cloridrato de minociclina emergiu como um composto promissor para o tratamento de diversas patologias (Morimoto *et al.*, 2005) e seu uso *off-label* está relacionado as suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Salameh *et al.*, 2015). Desse modo, o presente estudo teve como foco inicial avaliar o poder antioxidante desse composto, através de testes *in vitro*.

Como o tratamento dos camundongos com minocilina foi realizado pela via oral, decidiu-se avaliar o efeito da digestão simulada no potencial antioxidante *in vitro* da minociclina, comparando a sua forma bruta e digerida. O processo de digestão levou aumento da atividade da minociclina nos testes de folin-ciocalteu, atividade captura do ·OH e ORAC. De acordo com Faissner *et al.* (2017), a minociclina bruta apresentou atividade de ORAC melhor do que o ácido gálico, na dose de 5 µM. O uso de ácido ascórbico e ácido gálico como controles positivos, se deve ao fato de que, ambos possuem um potencial antioxidante conhecido (Arrigoni; De Tullio, 2002; Faissner *et al.*, 2018). Ademais, um estudo envolvendo animais com diabetes, observou que o uso de doxiciclina na dose de 15 mg/kg por 4 semanas, levou a uma maior atividade de ORAC em relação ao grupo diabético sem tratamento (Atalay *et al.*, 2011). Todavia, os dados na literatura para a atividade direta da minociclina são escassos (Kraus *et al.*, 2005) e até onde se sabe, esse é o primeiro trabalho que compara a atividade da minociclina antes e após o processo de digestão.

O processo de digestão simulado é um método rápido e de baixo custo para prever a bioacessibilidade e a bioatividade de moléculas (Colombo *et al.*, 2021; Minekus *et al.*, 2014). Realiza-se a simulação das fases oral, gástrica e intestinal através de adição de enzimas digestivas e alterações de pH (Kamal *et al.*, 2023; Minekus *et al.*, 2014). Estudos indicam que substâncias como soro de camelo (Kamal *et al.*, 2022) e tâmaras (Kamal *et al.*, 2023) demonstram a melhora da atividade antioxidante após a digestão pelo método de DDPH (Kamal *et al.*, 2022, 2023), corroborando os dados encontrados.

Adicionalmente, o efeito protetivo da minociclina bruta e digerida foi testado em eritrócitos. Conforme citado, as células vermelhas são de grande relevância biológica, pois, apresentam um poderoso sistema antioxidante (Liu; Huang, 2015; Remigante *et al.*, 2022). Nesse sentido, a minociclina inibiu a hemólise eritrocitária em ambas as formas, principalmente na dose de 100 µg/mL, que se apresentou melhor que a quercetina, um importante antioxidante natural (Remigante *et al.*, 2022). Ainda, a hemólise dos eritrócitos é desencadeada pela oxidação de lipídeos e proteínas de membrana (Liu; Huang, 2015), assim, a dosagem de TBARS se tornam importante, pois, este é considerado um marcador de peroxidação lipídica (Silva *et al.*, 2022). No presente estudo, houve proteção da minociclina bruta contra a peroxidação lipídica nas doses de 50 e 100 µg/mL. Em contraste, a dose de 25 µg/mL foi a única que apresentou proteção, após o processo de digestão. Esses dados, corroboram o estudo de Liu; Huang (2015) com chá preto na sua forma bruta, demonstrando efeitos contra a hemólise eritrocitária e peroxidação lipídica nas concentrações de 83 a 415 µg/mL.

A exposição ao AAPH levou a um aumento da produção de ERO, diminuição da atividade da catalase e aumento da atividade da SOD. O tratamento com a minociclina por sua vez em ambas as formas, não foi capaz de evitar essas alterações. Estudos anteriores demonstraram resultados opostos, onde a utilização de compostos fenólicos levou a uma diminuição da produção de ERO nos eritrócitos expostos a AAPH (Cruz *et al.*, 2024; Liu; Huang, 2015). Ainda, se observa uma melhora da atividade das enzimas antioxidantes pelo uso do chá preto (Liu; Huang, 2015). No entanto, faltam estudos que avaliem a atividade da minociclina em eritrócitos, porém, a comparação com outros compostos fenólicos é válida, visto que a minociclina é considerada um composto fenólico, devido a sua estrutura (Kazmi *et al.*, 2021). Ainda, acredita-se que a discrepância dos resultados pode estar associada aos mecanismos de ação de um composto em sistemas químicos e biológicos. Assim, apesar da minociclina ter apresentado uma potente atividade antioxidante nos testes químicos de folin-ciocalteu, atividade captura do $^{\cdot}OH$ e ORAC, esses testes não consideram os mecanismos complexos presentes nos sistemas biológicos, e por

isso, não preveem os reais benefícios de um composto (Granato, 2023; Granato *et al.*, 2018).

Para finalizar as análises *in vitro*, avaliou-se os efeitos da minociclina contra a oxidação plasmática. Foi observado que a minociclina apresentou resultados melhores do que os encontrados com a quercetina contra a formação de FLOP's, hidroperóxidos lipídicos e MDA. Adicionalmente, a minociclina digerida levou a um efeito mais pronunciado contra a formação de hidroperóxidos, quando comparada com sua forma bruta. Esses dados indicam, que a minocilina pode agir semelhantemente ao chá preto, suprimindo a oxidação de lipoproteínas plasmáticas, e com isso, inibir os efeitos oxidativos causados pelo cobre (Liu; Huang, 2015).

Ressalta-se que o processo de formação de compostos lipídicos é dividido em três partes: iniciação, propagação e terminação. Na etapa de iniciação o ferro ou cobre na presença de H_2O_2, irá ser oxidado mediante reação de Fenton, produzindo o $^{\cdot}OH$ ou peroxila, que por sua vez vão reagir com um lipídio insaturado, formando um radical lipídico. Na etapa de propagação esse radical lipídico reagirá com o oxigênio molecular, formando um radical peroxil, que pode associar a outro lipídio insaturado, formando um hidroperóxido lipídico e um radical lipídico, perpetuando a reação em cadeia. Na etapa de terminação, dois radicais peroxil reagem entre si, formando um não radical (Gaschler; Stockwell, 2017; Jomova; Valko, 2011; Pham *et al.*, 2013). Ainda, além do hidroperóxido lipídico que é um produto primário do processo de peroxidação, outros produtos secundários podem ser gerados, como o MDA (Ayala; Muñoz; Argüelles, 2014). Os compostos antioxidantes, podem atuar doando elétrons na fase de terminação, cessando o processo de peroxidação, bem como impedindo a etapa de propagação (Ayala; Muñoz; Argüelles, 2014; Gaschler; Stockwell, 2017; Pisoschi; Pop, 2015).

Assim, o potencial antioxidante da minociclina foi realçado quando a droga passou pelo processo de digestão simulada, pois teve efeitos parciais nos danos oxidativos em eritrócitos, com diminuição da porcentagem de hemólise e peroxidação lipídica. Ainda, esse composto foi eficiente em proteger o plasma contra os FIOP's tanto na sua forma bruta, como na digerida.

Conforme mencionado anteriormente, a dieta HC tem sido associada a expansão do tecido adiposo e, com isso, a liberação de mediadores inflamatórios que podem prejudicar a função cardiovascular (Ferreira *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2013). Além disso, ela tem sido associada ao desenvolvimento de comportamento tipo ansioso devido a maior produção de NO (Gomes *et al.*, 2020; Sanchez; Guerin; Fonken, 2019). Ainda é possível que ocorra uma alteração da microbiota intestinal, fato observado em estudos onde camundongos foram submetidos a diferentes modelos de dieta, como a dieta ocidental (Turnbaugh *et al.*, 2009) ou a da sacarose (Kong *et al.*, 2019). Inicialmente serão abordados os efeitos da dieta nos parâmetros comportamentais e na microbiota dos camundongos estudados. Em seguida, as alterações plasmáticas e cardiovasculares.

A associação da dieta HC com o comportamento do tipo ansioso ainda não está totalmente elucidada. Por isso, os animais passaram por testes comportamentais, dosagem de corticosterona e avaliação da microbiota. Para avaliar os parâmetros comportamentais, utilizamos o teste de LCE, onde uma maior permanência dos animais nos braços fechados sugere que ele está mais ansioso, pois os ambientes abertos são considerados aversivos (Almeida *et al.*, 2022; Pellow *et al.*, 1985). Além disso, analisou-se *grooming* e *head dipping* no LEC. O teste de *grooming* avalia o comportamento de autolimpeza do animal, sendo que o aumento do comportamento, indica um aumento da ansiedade (Hu *et al.*, 2017). O teste de *head dipping*, por sua vez, é resposta exploratória do animal, sendo caracterizado pelo movimento de “abaixar a cabeça” (“mergulha”) no LEC. Essa resposta exploratória tende a ser prejudicada em situações de estresse (Silva *et al.*, 2022).

No presente trabalho, verificou-se que os animais que consumiram a dieta HC, apresentaram uma diminuição da permanência nos braços abertos, além de aumento de *grooming* e diminuição de *head dipping*. Esses dados corroboram os estudos anteriores, onde roedores submetidos a dietas ricas em açúcares apresentaram aumento de comportamento tipo ansioso (Gomes *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2018). O tratamento dos camundongos que receberam a dieta com minociclina aumentou a permanência nos braços abertos e diminuiu o tempo de *grooming* nesses animais. De modo Semelhante, roedores submetidos

a estresse crônico imprevisível (Zhang *et al.,* 2019) ou acidente vascular cerebral isquêmico (Camargos *et al.,* 2020), apresentaram um aumento da entrada e permanência nos braços abertos do LCE quando tratados com minociclina em diferentes doses.

Sabe-se que, a disbiose causada pelo consumo de carboidratos refinados em excesso, favorece a diminuição de ácidos graxos de cadeia curta, que são importantes imunomoduladores. Com isso, ocorrem modificações da resposta imunológica da mucosa intestinal, afetando a integridade da camada de muco, culminando em uma maior permeabilidade intestinal (Christ; Lauterbach; Latz, 2019; Fajstova *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2020). Assim, ocorre uma maior infiltração de microrganismos e seus componentes, que são reconhecidos pelo sistema imunológico, gerando uma resposta pró-inflamatória, que de forma contínua, culmina na inflamação sistêmica de baixo grau, favorecendo o surgimento de diversas patologias (Christ; Lauterbach; Latz, 2019; Fajstova *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2020).

Além disso, a inflamação ocasionada pela dieta HC tem sido associada ao seu poder ansiogênico. Pois, durante o processo inflamatório, ocorre a liberação de mediadores como fator de necrose tumoral -α (TNF- α) e NO (Gomes *et al.*, 2018, 2020; Sanchez; Guerin; Fonken, 2019) que favorecem uma maior ativação do eixo HPA, que é responsável pela resposta ao estresse (Gomes *et al.*, 2020). Ademais, essa inflamação seria o ponto de encontro entre a obesidade e os transtornos de humor (Naseribafrouei *et al.*, 2014). No entanto, apesar do desenvolvimento do comportamento tipo ansioso pelos camundongos que receberam a dieta HC, não foram observadas alterações nos níveis de corticosterona neste estudo. Esse resultado pode indicar que a dieta esteja atuando como um estressor crônico, que leva a uma adaptação do organismo (Wen, 1998). Resultado similar foi observado em roedores submetidos a modelos de estresse por um período prolongado (Dal-Zotto; Martí; Armario, 2000; Du Preez *et al.*, 2021).

Ainda, estudos indicam que camundongos submetidos a diferentes modelos de dietas ricas em açúcares (Fleissner *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2019; Turnbaugh *et al.*, 2009) apresentam alterações da microbiota, com aumento de *Firmicutes e Proteobactérias,* acompanhado de diminuição de *Bacteroidetes*.

Esse mesmo perfil de disbiose foi observado em roedores submetidos a modelos de estresse agudo e crônico (Bailey *et al.*, 2011; Winter *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2021). De modo semelhante, verificou-se um aumento de aumento de *Firmicutes*, acompanhado de diminuição de *Bacteroidetes no* presente estudo, apesar de ter ocorrido uma diminuição das *Proteobactérias.* Até o momento, esse é o primeiro trabalho a avaliar se a dieta HC causa disbiose em camundongos. Esses dados reforçam a hipótese de que a dieta HC possa atuar como um fator ansiogênico.

A minociclina modulou beneficamente a microbiota dos animais estudados, o que foi observado coma diminuição de *Firmicutes*. Um efeito benéfico desse composto na microbiota já havia sido demonstrado em camundongos submetidos a modelo de estresse crônico imprevisível (Yang *et al.*, 2020), o que corrobora os achados do presente trabalho. Os efeitos da minociclina nos parâmetros de ansiedade, podem ainda estar associados à conhecida atividade neuroprotetora desse composto, que ativou a micróglia e diminui a neuroinflamação, em modelos de estresse oxidativo induzido por glutamato em células neuronais (Kraus *et al*., 2005) e isquemia cerebral em camundongos (Morimoto *et al*., 2005). No entanto, a não avaliação de componentes da resposta inflamatória e efeito neuroprotetor são limitações desse estudo.

Adicionalmente, o aumento da ingestão de ração nos animais que consumiram a dieta HC nas primeiras semanas de protocolo foi observado nesse trabalho, tornando-se não significativo após a 4°semana de dieta. Ainda, não houve diferenças do peso corporal dos camundongos ao longo das 12 semanas de consumo de dieta HC. Do mesmo modo, estudos anteriores, observaram um aumento da ingestão de ração nos camundongos que consumiam dieta HC nas primeiras semanas, porém isso não afetou o peso corporal ao longo do protocolo (Gomes *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2013). A não alteração do peso dos animais pela dieta HC, pode ser justificada, pelo fato da dieta ser isocalórica em relação a dieta padrão. Nesse sentindo, as alterações cardíacas decorrente da dieta HC estariam associadas à sua composição e não ao consumo calórico, visto que, o excesso de carboidratos refinados relaciona-se aos fatores de risco para

doenças cardiovasculares, como o aumento da adiposidade visceral e dislipidemia (FENG *et al.*, 2015).

Assim, apesar do peso dos camundongos não ter sido influenciado pela dieta, eles apresentaram um maior índice de adiposidade no presente trabalho. Estudos anteriores corroboram esses achados, pois demonstraram que o consumo da dieta HC pode aumentar o tecido adiposo já nos primeiros dias de dieta, independentemente da mudança de peso corporal (Bruno *et al.*, 2023; Oliveira *et al.*, 2013; Zicker *et al.*, 2019). Esse aumento ocorre por uma maior ativação das vias lipogênicas, devido ao seu alto índice glicêmico, sendo responsável por aumento de mediadores inflamatórios que favorecem as disfunções metabólicas (Campbell; Senior; Bell-Anderson, 2017; Ferreira *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2013).

Além disso, foi observado nesse estudo o aumento dos níveis de colesterol e triglicérides nos camundongos expostos a dieta HC. De acordo com a literatura, esse tipo de dieta leva a uma disfunção do metabolismo lipídico (Oliveira *et al.*, 2013; Zicker *et al.*, 2019), que, por sua vez, resulta na formação de placas ateroscleróticas (Kamalakkannan *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022). Desse modo, quando a atividade da CK-MB foi avaliada, observou-se um aumento dessa isoenzima nos animais expostos a dieta HC. A CK-MB é um marcador de dano no miocárdio, e está aumentada quando existe lesões ou doenças cardiovasculares pré-estabelecidas (Hoshino *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2021). Donner *et al.* (2015), verificaram que ratos submetidos a dieta de cafeteria, composta por 65% de carboidrato e 16% de gordura, apresentaram maiores níveis de CK- MB, indicando, que a dieta HC possa atuar de forma semelhante, sendo um fator de risco para complicações cardiovasculares (Donner *et al.*, 2015).

Diferente do presente estudo, Coker *et al.* (2022) observaram que o tratamento com minociclina por 6 semanas na dose de 40mg/kg em camundongos C57BL/6J submetidos a uma dieta rica em gordura levou a diminuição do índice de adiposidade (Coker *et al.*, 2022). Ainda, a administração de minociclina nas doses de 45 e 90 mg/kg por 3 semanas, causou efeitos protetores em ratos com cardiotoxicidade induzida por doxorrubicina, observados pela diminuição da CK-MB (Naderi *et al.*, 2023). Essas diferenças

podem estar associadas ao tempo de tratamento ou ao diferente tipo de modelo experimental.

Por outro lado, em relação ao perfil lipídico, a minociclina atuou diminuindo níveis de triglicérides, assim como o observado em ratos diabéticos tratados com esse composto (Glauce *et al.*, 2014). E, apesar de ela não modificar os níveis de colesterol, a diminuição de triglicérides é um indicativo que a minociclina melhorou o perfil lipídico no presente estudo.

Em relação a avaliação do estresse oxidativo, a dieta HC não foi capaz de alterar os níveis de TBARS, todavia, houve uma diminuição dos níveis de GSH e aumento dos níveis de ERO *in situ*, O_2^- e H_2O_2. Embora Bruno *et al.* (2023), verificaram que o consumo da dieta HC por 8 semanas levou a um aumento de ERO *in situ* e TBARS no tecido cardíaco, o presente estudo é o primeiro que avalia os efeitos do consumo prologando da dieta HC, sobre o estresse oxidativo cardíaco durante 12 semanas. Os resultados encontrados, vão ao encontro de estudos que observaram um aumento de MDA cardíaca em ratos que consumiram dietas ricas em frutose (Putakala *et al*., 2017; Ahmed *et al*., 2021; Ahmed *et al*., 2023). Ainda, o consumo de frutose levou a um aumento dos níveis de NADPH oxidase, O_2^- e H_2O_2 (El-Wakf *et al*., 2024), além ocasionar a depleção de GSH (Putakala *et al*., 2017; El-Wakf *et al*., 2024) no tecido cardíaco de ratos.

Conforme mencionado, as dietas à base de açucares regulam positivamente iNOS, levando a uma maior produção de NO (Gomes *et al.*, 2020; Pakdeechote *et al.*, 2014). Paralelamente, elas levam a uma maior atividade da NADPH oxidase, resultando em uma maior produção de ERO no sistema cardiovascular (Roberts *et al.*, 2000, 2006). O excesso de O_2^- reage com o NO para formar o peroxinitrito, um oxidante potente, responsável pela modulação das funções celulares por ocasionar nitração de proteínas (Bourgoin *et al.*, 2013; Pakdeechote *et al.*, 2014; Roberts *et al.*, 2000). É importante ressaltar, que a não alteração nos níveis de TBARS no presente estudo pode estar relacionada a baixa especificidade da técnica, pois, o TBA não reage apenas com o MDA, mas com outros produtos de peroxidação, limitando assim a acessibilidade para a reação MDA-TBA (Aguilar Diaz De Leon; Borges, 2020).

Além disso, nesse trabalho foram avaliadas a atividade das enzimas catalase SOD e GPx. A dieta HC não alterou a atividade da SOD, mas alterou a da catalase e da GPx. De acordo com a literatura, ratos que receberam dieta contendo 35 % carboidratos refinados, 50 % de gordura e 2 % de colesterol por 12 semanas apresentaram diminuição da atividade da SOD e catalase cardíaca (Ahmed *et al.*, 2023). Semelhantemente, ratos submetidos a uma dieta rica em frutose por 60 dias (Putakala *et al.*, 2017) apresentaram diminuição na atividade da catalase, SOD e GPx no tecido cardíaco. No entanto, o aumento da atividade da catalase e da GPx verificado nesse estudo, pode sugerir uma tentativa de compensação da enzima contra o aumento dos níveis de ERO *in situ*, O_2^- e H_2O_2 observados (Arja *et al.*, 2013; Gasparini *et al.*, 2021). Ainda, o aumento da atividade da GPx nos camundongos que receberam dieta HC corrobora a diminuição de GSH nesses animais, pois, como citado anteriormente, a GPx realiza a redução do H_2O_2 mediante oxidação GSH (Jomova *et al.*, 2024). Adicionalmente, a não alteração na atividade da SOD pode estar associada ao modelo de dieta utilizado.

O tratamento com minociclina reverteu a diminuição de GSH e o aumento de ERO causado pela dieta HC, além de restaurar a atividade da catalase e diminuir GPx. Nesse sentido, ratos diabéticos tratados com minociclina na dose de 50 mg/kg durante 15 dias, apresentaram aumento dos níveis de GSH, o que corrobora os dados do presente trabalho (Mehta; Banerjee, 2019). De modo semelhante, o efeito antioxidante da minociclina foi demonstrada em modelo de cardiotoxicidade induzida em ratos onde foi observada uma diminuição nos níveis de MDA e restauração da atividade das enzimas antioxidantes (Naderi *et al.*, 2023). Por fim, o tratamento com minociclina apresentou um efeito cardioprotetor em modelo de cardioplegia em coelhos com diminuição dos níveis de MDA e nitrotirosina (Salameh *et al.*, 2015).

Conforme descrito anteriormente, o estresse oxidativo pode ativar as MMPs (Kandasamy *et al.*, 2010; Van der Pol *et al.*, 2019), que possuem ação pró-fibrótica, favorecendo a síntese e degradação de colágeno, principalmente colágeno tipo I (Hori *et al.*, 2012; Cau *et al.*, 2015). Nesse sentido, os camundongos submetidos a dieta HC tiveram aumentos da atividade gelatinolítica da MMP-9, por zimografia em gel, mas não da MMP-2 no presente

trabalho. Esses resultados divergem dos de Bruno *et al*. (2023), que demonstraram aumento da atividade de MMP-2 por zimografia em gel em camundongos tratados com dieta HC por 4 semanas, sem alteração da atividade da MMP-9. No entanto, quando avaliados por 8 semanas de tratamento com dieta HC, esses animais não apresentaram mais essa alteração (Bruno *et al.*, 2023). Assim, é provável que a ativação da MMP-2 ocorra apenas em uma fase inicial de consumo da dieta e que com o passar do tempo passe a ser observada a ativação a MMP-9, sendo importante ressaltar que neste estudo os animais foram submetidos a 12 semanas de dieta.

Em relação a atividade gelatinolítica *in situ*, houve um aumento da atividade no grupo que foi submetido a dieta HC, sendo que, essa alteração pode estar relacionada com a maior a atividade da MMP-9 observada na zimografia em gel. Ademais, como descrito, a MMP-9 regula os processos inflamatórios, que, por sua vez, iram favorecer a expressão da mesma, e por isso, tem grande importância nas doenças cardiovasculares (Hu *et al.*, 2007; Yabluchanskiy *et al.*, 2013). No entanto, não foram observados infiltrados inflamatórios nos corações dos animais nesse estudo. Esse resultado difere dos achados de Abu-Elsaad; El-Karef (2018), que verificam presença de infiltrados inflamatórios no tecido cardíaco de ratos submetidos a uma dieta rica em carboidratos e gordura por 16 semanas (Abu-Elsaad; El-Karef, 2018). Essa discrepância pode estar associada ao modelo animal, tempo de dieta ou tipo de dieta utilizada.

Além disso, o tratamento com a minociclina foi capaz de reverter o aumento da atividade das MMPs . Nesse sentindo, um estudo demonstrou que ratos submetidos a isquemia e tratados com minociclina na dose de 25 mg/kg a cada doze horas, tiveram uma redução da atividade de MMP-9 em relação ao grupo controle no tecido cardíaco (Romero-Perez *et al.*, 2008). Ademais, ratos com cardite autoimune tratados com minociclina na dose de 50 mg/kg durante 3 semanas, apresentaram diminuição da atividade de MMP-9, mas não MMP-2 (Matsumoto; Park; Kohyama, 2009).

Corroborando a alteração da atividade da MMP-9, foi observado o aumento da porcentagem de colágeno intersticial no tecido cardáco dos animais submetidos a dieta HC. O aumento da deposiçao de cólageno favorece o desenvolvimento de fibrose cardíaca, culminando na insuficiência cardíaca (Cau

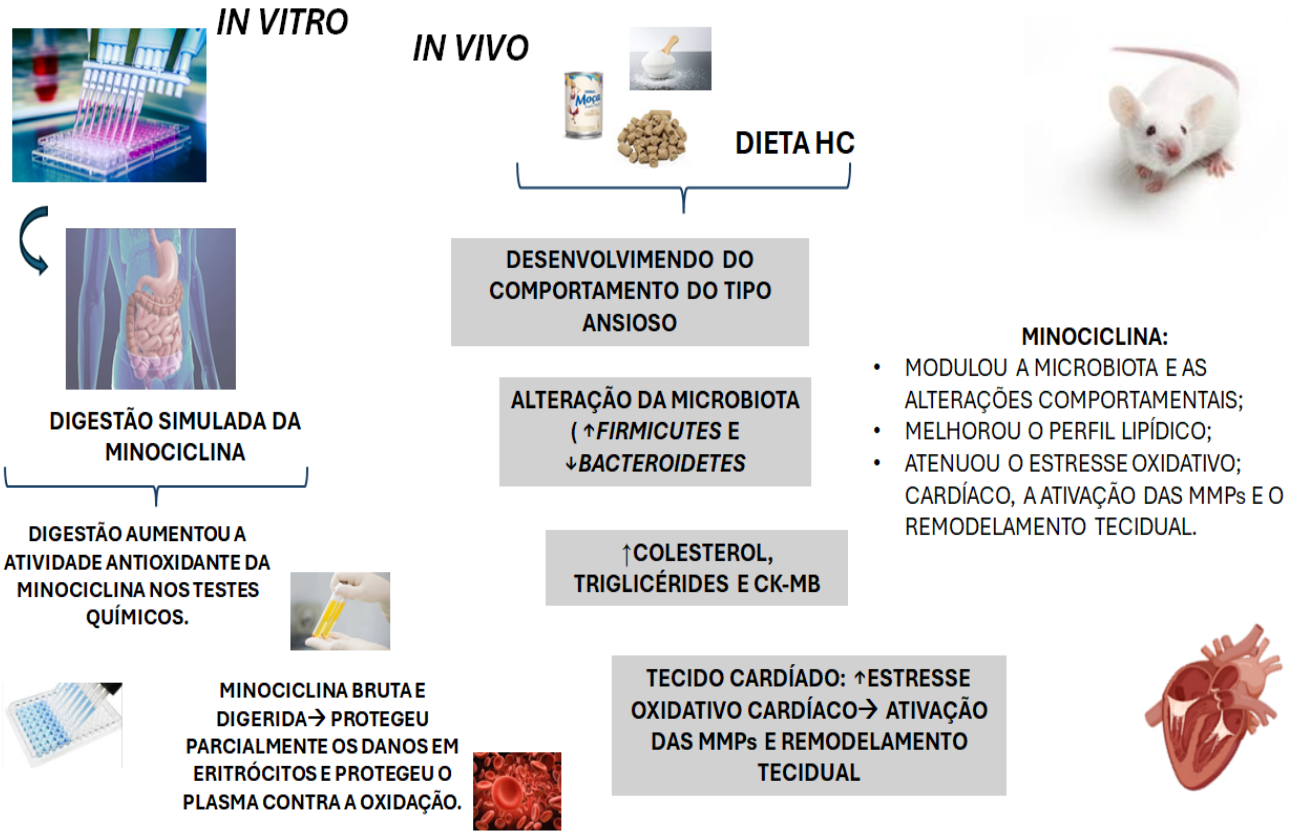
et al., 2015; Hori *et al.*, 2012). O aumento de colágeno no tecido cardiaco, já havia sido demonstrado em roedores que foram tratados com dietas ricas em açúcares (Bruno *et al.*, 2023; Giani *et al.*, 2010; Mellor *et al.*, 2011). Ainda, o tratamento com a minociclina reverteu esse dano, corroborando estudos em que o tratamento com minociclina diminuiu a deposição de colágeno no coração de roedores com carga tumoral (Devine; Eichenseer; Wold, 2016) ou miocardite autoimune (Han *et al.*, 2011). Essa melhora, possivelmente está relacionada com efeito inibitório da minociclina nas MMPs e sua atividade antioxidante (Devine; Eichenseer; Wold, 2016).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados *in vitro* indicam que a minociclina apresenta um bom potencial antioxidante, sendo esse realçado quando a droga passa pelo processo de digestão simulada. O composto agiu parcialmente nos danos em eritrócitos, diminuição a porcentagem de hemólise e peroxidação lipídica e protegeu o plasma contra os FIOP's tanto na sua forma bruta, como na digerida (Figura 28).

Em relação aos ensaios *in vivo*, consumo da dieta HC por 12 semanas alterou a microbiota, levou ao desenvolvimento de um comportamento do tipo ansioso, aumentou o estresse oxidativo cardíaco e ativação das MMPs, resultando em remodelamento cardíaco. O tratamento com minociclina foi capaz de modular a microbiota e as alterações comportamentais causadas pela dieta e atenuou o estresse oxidativo, a atividade da MMP e o remodelamento cardíaco causado pela dieta HC (Figura 28).

Figura 28 - Conclusões do estudo.



Fonte: Da autora.

REFERÊNCIAS

ABU-ELSAAD, Nashwa; EL-KAREF, Amr. The Falconoid Luteolin Mitigates the Myocardial Inflammatory Response Induced by High-Carbohydrate/High-Fat Diet in Wistar Rats. **Inflammation**, [*S. l.*], v. 41, n. 1, p. 221–231, 2018.

AEBI, Hugo. [13] Catalase *in Vitro*. **Methods in Enzymology**, [*S. l.*], v. 105, n. C, p. 121–126, 1984.

AGUILAR DIAZ DE LEON, Jesús; BORGES, Chad R. Evaluation of oxidative stress in biological samples using the thiobarbituric acid reactive substances assay. **Journal of Visualized Experiments**, [*S. l.*], v. 2020, n. 159, 2020.

AGWUH, Kenneth N.; MACGOWAN, Alasdair. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylcyclines. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [*S. l.*], v. 58, n. 2, p. 256-265, 2006.

AHMED, Osama A.A. *et al.* A Nano-Pharmaceutical Formula of Quercetin Protects from Cardiovascular Complications Associated with Metabolic Syndrome. **Frontiers in Pharmacology**, [*S. l.*], v. 12, 2021.

AHMED, Mobeen Ghulam *et al.* Caryopteris odorata and its metabolite coumarin attenuate characteristic features of cardiometabolic syndrome in high-refined carbohydrate-high fat-cholesterol-loaded feed-fed diet rats. **Frontiers in Pharmacology**, [*S. l.*], v. 14, 2023.

ALI, Mohammad A.M. *et al.* Calpain inhibitors exhibit matrix metalloproteinase-2 inhibitory activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [*S. l.*], v. 423, n. 1, p. 1–5, 2012.

ALMEIDA, Carolina Aparecida Faria *et al.* Ayahuasca, a psychedelic beverage, modulates neuroplasticity induced by ethanol in mice. **Behavioural Brain Research**, [*S. l.*], v. 416, 2022.

ALZOUBI, Karem H. *et al.* Vitamin E prevents high-fat high-carbohydrates diet-induced memory impairment: The role of oxidative stress. **Physiology and Behavior**, [*S. l.*], v. 119, p. 72–78, 2013.

ARJA, Cholendra *et al.* Oxidative stress and antioxidant enzyme activity in South Indian male smokers with chronic obstructive pulmonary disease. **Respirology**, [*S. l.*], v. 18, n. 7, p. 1069–1075, 2013.

ARRIGONI, Oreste; DE TULLIO, Mario C. Ascorbic acid: Much more than just an antioxidant. [*S. l.*], 1569, n. 1–3, p. 1–9, 2002.

ATALAY, Mustafa *et al.* Treatments with sodium selenate or doxycycline offset diabetes-induced perturbations of thioredoxin-1 levels and antioxidant capacity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [*S. l.*], v. 351, n. 1–2, p. 125–131, 2011.

AYALA, Antonio; MUÑOZ, Mario F.; ARGÜELLES, Sandro. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-

hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [*S. l.*], v. 2014, 2014.

BAILEY, Michael T. *et al.* Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: Implications for stressor-induced immunomodulation. **Brain, Behavior, and Immunity**, [*S. l.*], v. 25, n. 3, p. 397–407, 2011.

BECIROVIC-AGIC, Mediha *et al.* Infarct in the heart: What's MMP-9 got to do with it?. **Biomolecules**, [*S. l.*], v. 11, n.4, 2021.

BOURGOIN, Frédéric *et al.* Effects of tempol on endothelial and vascular dysfunctions and insulin resistance induced by a high-fat high-sucrose diet in the rat. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, [*S. l.*], v. 91, n. 7, p. 547–561, 2013.

BRODKORB, André *et al.* INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, [*S. l.*], v. 14, n. 4, p. 991–1014, 2019.

BRUNO, Alexandre Santos *et al.* Cardiac disturbances and changes in tissue cytokine levels in mice fed with a high-refined carbohydrate diet. **Cytokine**, [*S. l.*], v. 166, 2023.

CAMARGOS, Quezya Mendes *et al.* Minocycline treatment prevents depression and anxiety-like behaviors and promotes neuroprotection after experimental ischemic stroke. **Brain Research Bulletin**, [*S. l.*], v. 155, p. 1–10, 2020.

CAMPBELL, Grace J.; SENIOR, Alistair M.; BELL-ANDERSON, Kim S. Metabolic effects of high glycaemic index diets: A systematic review and meta-analysis of feeding studies in mice and rats. **Nutrients**, [*S. l.*], v. 9, n. 7, 2017.

CARDA, Ana P.P. *et al.* Acute restraint stress induces endothelial dysfunction: Role of vasoconstrictor prostanoids and oxidative stress. **Stress**, [*S. l.*], v. 18, n. 2, p. 233–243, 2015.

CASTRO, Michele M. *et al.* Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. **Atherosclerosis**, [*S. l.*], v. 198, n. 2, 2008.

CAU, Stefany B.A. *et al.* The Nuclear Factor kappaB Inhibitor Pyrrolidine Dithiocarbamate Prevents Cardiac Remodelling and Matrix Metalloproteinase-2 Up-Regulation in Renovascular Hypertension. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, [*S. l.*], v. 117, n. 4, p. 234–241, 2015.

CERON, C. S. *et al.* Spironolactone and hydrochlorothiazide exert antioxidant effects and reduce vascular matrix metalloproteinase-2 activity and expression in a model of renovascular hypertension. **British Journal of Pharmacology**, [*S. l.*], v. 160, n. 1, 2010.

CHEN, Zhi *et al.* Comparative metaproteomics analysis shows altered fecal microbiota signatures in patients with major depressive disorder. **NeuroReport**, [*S. l.*], v. 29, n. 5, p. 417–425, 2018.

CHRIST, Anette; LAUTERBACH, Mario; LATZ, Eicke. Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection. **Immunity**, [*S. l.*], v. 51, n. 5, p. 794-811, 2019.

CILDIR, Gökhan; AKINCILAR, Semih Can; TERGAONKAR, Vinay. Chronic adipose tissue inflammation: All immune cells on the stage. **Trends in Molecular Medicine**, [*S. l.*], v. 19, n. 8, p. 487–500, 2013.

CNUBBEN, Nicole H. P. *et al.* The interplay of glutathione-related process in antioxidant defense. **Enviromental Toxicology and Pharmacology**, [*S. l.*], v. 10, p. 141–152, 2001.

COKER, Caitlin R. *et al.* Minocycline Reduces Hypothalamic Microglia Activation and Improves Metabolic Dysfunction in High Fat Diet-Induced Obese Mice. **Frontiers in Physiology**, [*S. l.*], v. 13, 2022.

COLLINS, Stephen M.; SURETTE, Michael; BERCIK, Premysl. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. **Nature Reviews Microbiology**, [*S. l.*], v. 10, p. 735-742, 2012.

COLOMBO, Raffaella *et al.* Advances in static: *In vitro* digestion models after the COST action Infogest consensus protocol. **Food & Function**, [*S. l.*], 2021.

CRUZ, Fábio C. *et al.* Behavioral and neuroendocrine effects of the exposure to chronic restraint or variable stress in early adolescent rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [*S. l.*], v. 30, n. 1, p. 19–23, 2012.

CRUZ, Thiago Mendanha *et al.* High-throughput synchronous erythrocyte cellular antioxidant activity and protection screening of phenolic-rich extracts: Protocol validation and applications. **Food Chemistry**, [*S. l.*], v. 440, p. 138281, 2024.

CRYAN, John F.; DINAN, Timothy G. Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on brain and behaviour. **Nature Reviews Neuroscience**, [*S. l.*], v. 13, p. 701-712, 2012.

DALVI, A.; RODGERS, R. J. Behavioral effects of diazepam in the murine plus-maze: Flumazenil antagonism of enhanced head dipping but not the disinhibition of open-arm avoidance. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [*S. l.*], v. 62, n. 4, p. 727–734, 1999.

DAL-ZOTTO, Silvina; MARTÍ, Octavi; ARMARIO, Antonio. Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. **Behavioural Brain Research**, [*S. l.*], v. 114, n. 1-2, p. 175-181, 2000.

DE BARRIOS FREITAS, Rodrigo *et al.* Euterpe edulis effects on cardiac and renal tissues of Wistar rats fed with cafeteria diet. **Nutrición Hospitalaria**, [*S. l.*], v. 34, n. 1, 2017.

DEHGHAN, Mahshid *et al.* Associations of fats and carbohydrate intake with cardiovascular disease and mortality in 18 countries from five continents

(PURE): a prospective cohort study. **The Lancet**, [*S. l.*], v. 390, n. 10107, p. 2050–2062, 2017.

DE NORONHA, Sylvana I.S. R. *et al*. High-fat diet, microbiome-gut-brain axis signaling, and anxiety-like behavior in male rats. **Biological Research**, [*S. l.*], v. 57, n. 1, 2024.

DEVINE, Raymond D.; EICHENSEER, Clayton M.; WOLD, Loren E. Minocycline attenuates cardiac dysfunction in tumor-burdened mice. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, [*S. l.*], v. 100, p. 35–42, 2016.

DO VALE, Gabriel T. *et al.* Ethanol consumption increases renal dysfunction and mortality in a mice model of sub-lethal sepsis. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, [*S. l.*], p. 1–35, 2020.

DONNER, Daniel G. *et al.* Impact of diet-induced obesity and testosterone deficiency on the cardiovascular system: A novel rodent model representative of males with testosterone-deficient metabolic syndrome (TDMetS). **PLoS ONE**, [*S. l.*], v. 10, n. 9, 2015.

DU PREEZ, Andrea *et al.* Chronic stress followed by social isolation promotes depressive-like behaviour, alters microglial and astrocyte biology and reduces hippocampal neurogenesis in male mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, [*S. l.*], v. 91, p. 24–47, 2021.

ELIZABETH, Leonie *et al.* Ultra-processed foods and health outcomes: A narrative review. **Nutrients**, [*S. l.*], v. 12, n. 7, 2020.

EL- WAKF, Azza Mohamad *et al.* Fennel seeds extract prevents fructose-induced cardiac dysfunction in a rat model of metabolic syndrome via targeting abdominal obesity, hyperuricemia and NF-κβ inflammatory pathway. **Tissue and Cell**, [*S. l.*], v. 88, 2024.

ERNST, Orna; ZOR, Tsaffrir. Linearization of the Bradford protein assay. **Journal of Visualized Experiments**, [*S. l.*], n. 38, 2010.

ESCHER, Graziela Bragueto *et al.* Chemical study, antioxidant, anti-hypertensive, and cytotoxic/cytoprotective activities of Centaurea cyanus L. petals aqueous extract. **Food and Chemical Toxicology**, [*S. l.*], v. 118, p. 439–453, 2018.

FAISSNER, Simon *et al.* Unexpected additive effects of minocycline and hydroxychloroquine in models of multiple sclerosis: Prospective combination treatment for progressive disease?. **Multiple Sclerosis Journal**, [*S. l.*], v. 24, n. 12, 2018.

FAJSTOVA, Alena *et al.* Diet Rich in Simple Sugars Promotes Pro-Inflammatory Response via Gut Microbiota Alteration and TLR4 Signaling. **Cells**, [*S. l.*], v. 9, n. 12, 2020.

FENG, Rennan *et al.* High carbohydrate intake from starchy foods is positively associated with metabolic disorders: A Cohort Study from a Chinese population. **Scientific Reports**, [*S. l.*], v. 5, 2015.

FERREIRA, Adaliene Versiani Matos *et al.* Distinct metabolic pathways trigger adipocyte fat accumulation induced by high-carbohydrate and high-fat diets. **Nutrition**, [*S. l.*], v. 30, n. 10, p. 1138–1143, 2014.

FLEISSNER, Christine K. *et al.* Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. **British Journal of Nutrition**, [*S. l.*], v. 104, n. 6, p. 919–929, 2010.

FLORES-FUENTES, Nayely *et al.* Motor learning impairment in rats under a high sucrose diet. **Physiology and Behavior**, [*S. l.*], v. 234, 2021.

FREDERIKS, Wilma M.; MOOK, Olaf R.F. Metabolic mapping of proteinase activity with emphasis on *in situ* zymography of gelatinases: Review and protocols. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, [*S. l.*], v. 52, n. 6, p. 711–722, 2004.

GARCIA, Vinicius P. *et al.* Exogenous L-arginine reduces matrix metalloproteinase-2 and -9 activities and oxidative stress in patients with hypertension. **Life Sciences**, [*S. l.*], v. 157, p. 125–130, 2016.

GARRIDO-MESA, N.; ZARZUELO, A.; GÁLVEZ, J. Minocycline: Far beyond an antibiotic. **British Journal of Pharmacology**, [*S. l.*], v. 169, n. 2, p. 337-352, 2013.

GASCHLER, Michael M.; STOCKWELL, Brent R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, [*S. l.*], v, 484, n. 3, p. 419-425, 2017.

GASPARINI, Patrícia Vasconcelos Fontana *et al.* High-fat and combined high-fat and sucrose diets promote cardiac oxidative stress independent of Nox2 redox regulation and obesity in rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [*S. l.*], v. 55, n. 5, p. 618–634, 2021.

GIANI, Jorge F *et al.* Angiotensin-(1-7) improves cardiac remodeling and inhibits growth-promoting pathways in the heart of fructose-fed rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, [*S. l.*], v. 298, p. 1003–1013, 2010.

GLAUCE, S. Barros Viana *et al.* Minocycline decreases blood glucose and triglyceride levels and reverses histological and immunohisto-chemical alterations in pancreas, liver and kidney of alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Diabetes and Endocrinology**, [*S. l.*], v. 5, n. 4, p. 29–40, 2014.

GOMES, Júlia Ariana Souza *et al.* A high-refined carbohydrate diet facilitates compulsive-like behavior in mice through the nitric oxide pathway. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, [*S. l.*], v. 80, n. April, p. 61–69, 2018.

GOMES, Julia A.S. *et al.* High-refined carbohydrate diet consumption induces neuroinflammation and anxiety-like behavior in mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, [*S. l.*], v. 77, 2020.

GRANATO, Daniel *et al.* Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban *in vitro* screening methods?. **Food Chemistry**, [*S. l.*], v. 264, p. 471–475, 2018.

GRANATO, Daniel. Cellular antioxidant activity measurement: An alternative to chemical antioxidant methods?. **Food Safety and Health**, [*S. l.*], v. 1, n. 1, p. 9–12, 2023.

GRANATO, Daniel *et al.* Characterization of Brazilian lager and brown ale beers based on color, phenolic compounds, and antioxidant activity using chemometrics. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [*S. l.*], v. 91, n. 3, p. 563–571, 2011.

GRIENDLING, Kathy K.; SORESCU, Dan; USHIO-FUKAI, Masuko. NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and disease. **Circulation Research**, [*S. l.*], v. 86, n. 5, p. 494–501, 2000.

GUIMARÃES, Danielle Aparecida *et al.* Inibição de metaloproteinases da matriz extracelular: uma possível estratégia terapêutica na hipertensão arterial?. **Revista Brasileira Hipertensão**, [*S. l.*], v. 17, n. 4, p. 226–230, 2010.

HAGHI-AMINJAN, Hamed *et al.* The role of minocycline in alleviating aluminum phosphide-induced cardiac hemodynamic and renal toxicity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [*S. l.*], v. 64, p. 26–40, 2018.

HAN, Li-na *et al.* Effects of matrix metalloproteinase-9 inhibitor in Lewis rats with experimental autoimmune myocarditis. **Zhonghua xin xue guan bing za zhi**, [*S. l.*], v. 39, n. 2, 2011.

HAN, Yuan Yuan *et a*l. Microglial activation in the dorsal striatum participates in anxiety like behavior in Cyld Knockout mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, [*S. l.*], v. 89, p. 326-338, 2020.

HAZRA, Sugata *et al.* Impact of high-fat diet on vasoconstrictor reactivity of white and brown adipose tissue resistance arteries. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, [*S. l.*], v. 316, n. 3, p. H485–H494, 2019.

HENRIET, Patrick; EMONARD, Hervé. Matrix metalloproteinase-2: Not (just) a “hero” of the past. **Biochimie**, [*S. l.*], v. 166, p. 223–232, 2019.

HERMAN, James P *et al.* Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. Comprehensive Physiology. **Comprehensive Physiology**, [*S. l.*], v. 6, n. 2, p. 603–621, 2016.

HORI, Yasutomo *et al.* Matrix metalloproteinase-2 stimulates collagen-I expression through phosphorylation of focal adhesion kinase in rat cardiac fibroblasts. **Am J Physiol Cell Physiol**, [*S. l.*], v. 303, p. 947–953, 2012.

HOSHINO, Tadashi *et al.* Development and performance of an enzyme immunoassay to detect creatine kinase isoenzyme MB activity using anti-mitochondrial creatine kinase monoclonal antibodies. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, [*S. l.*], v. 69, n. 6, p. 687–695, 2009.

HOWE, Adina *et al.* Divergent responses of viral and bacterial communities in the gut microbiome to dietary disturbances in mice. **ISME Journal**, [*S. l.*], v. 10, n. 5, p. 1217–1227, 2016.

HU, Frank B. Are refined carbohydrates worse than saturated fat?. **American Journal of Clinical Nutrition**, [*S. l.*], v. 91, n. 6, p. 1541–1542, 2010.

HU, Jialiang *et al.* Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, [*S. l.*], v. 6, n. 6, p. 480–498, 2007.

HU, Congli *et al.* Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. **PLoS ONE**, [*S. l.*], v. 12, n. 9, p. 1–15, 2017.

JANDHYALA, Sai Manasa *et al.* Role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology**, [*S. l.*], v. 21, n. 29, p. 8836–8847, 2015.

JENSEN, Majken K. *et al.* Fluorescent oxidation products and risk of coronary heart disease: A prospective study in women. **Journal of the American Heart Association**, [*S. l.*], v. 2, n. 5, 2013.

JOHNSON, Richard J. *et al.* Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease1-3. **American Journal of Clinical Nutrition**, [*S. l.*], v. 86, n. 4, p. 899–906, 2007.

JOMOVA, Klaudia *et al.* Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. **Archives of Toxicology**, [*S. l.*], v. 98, n. 5, p. 1323-1367, 2024.

JOMOVA, Klaudia; VALKO, Marian. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, [*S. l.*], v. 283, n. 2-3, p. 65-87, 2011

KAMAL, Hina *et al.* Camel whey protein with enhanced antioxidative and antimicrobial properties upon simulated gastro-intestinal digestion. **Nutrition and Health**, [*S. l.*], 2022.

KAMAL, Hina *et al.* Nutraceutical and bioactive potential of high-quality date fruit varieties (Phoenix dactylifera L.) as a function of in-vitro simulated gastrointestinal digestion. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [*S. l.*], v. 223, n. June 2022, p. 115113, 2023.

KAMALAKKANNAN, Soundararajan *et al.* Emu oil decreases atherogenic plaque formation in cafeteria diet-induced obese rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [*S. l.*], v. 96, n. 9, p. 3063–3068, 2016.

KAMEDA, Kunihiko *et al.* Correlation of oxidative stress with activity of matrix metalloproteinase in patients with coronary artery disease. Possible role for left ventricular remodelling. **European Heart Journal**, [*S. l.*], v. 24, n. 24, p. 2180–2185, 2003.

KANDASAMY, Arulmozhi D. *et al.* Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: Beyond the matrix. **Cardiovascular Research**, [*S. l.*], v. 85, n. 3, p. 413–423, 2010.

KAZMI, Syed Akif Raza *et al.* Minocycline-derived silver nanoparticles for assessment of their antidiabetic potential against alloxan-induced diabetic mice. **Pharmaceutics**, [*S. l.*], v. 13, n. 10, 2021.

KIM, Chong Su *et al.* Experiencing social exclusion changes gut microbiota composition. **Translational Psychiatry**, [*S. l.*], v. 12, n. 1, 2022.

KHAN, Shahanshah *et al.* Dietary simple sugars alter microbial ecology in the gut and promote colitis in mice. **Science Translacional Medicine**, [*S. l.*], v. 12, n. 567, 2020.

KŁADNA, Aleksandra *et al.* Evaluation of the antioxidant activity of tetracycline antibiotics *in vitro*. **Luminescence**, [*S. l.*], v. 27, n. 4, p. 249–255, 2012.

KONG, Cheng *et al.* Probiotics improve gut microbiota dysbiosis in obese mice fed a high-fat or high-sucrose diet. **Nutrition**, [*S. l.*], v. 60, p. 175–184, 2019.

KRAUS, Richard L. *et al.* Antioxidant properties of minocycline: Neuroprotection in an oxidative stress assay and direct radical-scavenging activity. **Journal of Neurochemistry**, [*S. l.*], v. 94, n. 3, p. 819–827, 2005.

KUMAR, Anil *et al*. Potencial role of licofenole, minocycline and their combination against chronic fatigue stress behavioral, biochemical and mitochondrial alterations in mice. [*S. l.*], 64, n. 5, p. 1105-1115,2012.

KURZEPA, Jacek *et al.* Collagenases and gelatinases in bone healing. The focus on mandibular fractures. **Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences**, [*S. l.*], v. 27, n. 2, p. 121–126, 2014.

LAU, Eva *et al.* The role of I-FABP as a biomarker of intestinal barrier dysfunction driven by gut microbiota changes in obesity. **Nutrition and Metabolism**, [*S. l.*], v. 13, n. 1, 2016.

LEITÃO, Ana Paula de Azevedo. **AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA DE DUAS FORMULAÇÕES DE MINOCICLINA EM CONDIÇÕES DE JEJUM E APÓS DIETA RICA EM CÁLCIO**. 2001. 181 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2001.

LIU, Shumin; HUANG, Huihua. Assessments of antioxidant effect of black tea extract and its rationals by erythrocyte haemolysis assay, plasma oxidation assay and cellular antioxidant activity (CAA) assay. **Journal of Functional Foods**, [*S. l.*], v. 18, p. 1095–1105, 2015.

MACHADO, Livia S. *et al.* Delayed minocycline inhibits ischemia-activated matrix metalloproteinases 2 and 9 after experimental stroke. **BMC Neuroscience**, [*S. l.*], v. 7, p. 1–7, 2006.

MARGRAF, Tiago *et al.* Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates. **Journal of Food Science**, [*S. l.*], v. 80, n. 11, p. C2397–C2403, 2015.

MARIN, Marcelo T.; CRUZ, Fabio C.; PLANETA, Cleopatra S. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. **Physiology and Behavior**, [*S. l.*], v. 90, n. 1, p. 29–35, 2007.

MARTINEZ, Marcio L.L. *et al.* Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-2 activity and reverses vascular dysfunction in renovascular hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**, [*S. l.*], v. 591, n. 1–3, 2008.

MATA-SANTOS, Hílton Antônio *et al.* Silymarin reduces profibrogenic cytokines and reverses hepatic fibrosis in chronic murine schistosomiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [*S. l.*], v. 58, n. 4, p. 2076–2083, 2014.

MATSUMOTO, Yoh; PARK, Il-Kwon; KOHYAMA, Kuniko. Matrix Metalloproteinase (MMP)-9, but Not MMP-2, Is Involved in the Development and Progression of C Protein-Induced Myocarditis and Subsequent Dilated Cardiomyopathy. **The Journal of Immunology**, [*S. l.*], v. 183, n. 7, p. 4773–4781, 2009.

MEHTA, Bina K.; BANERJEE, Sugato. Minocycline reverses diabetes-associated cognitive impairment in rats. **Pharmacological Reports**, [*S. l.*], v. 71, n. 4, p. 713–720, 2019.

MELLOR, Kimberley M. *et al.* Myocardial autophagy activation and suppressed survival signaling is associated with insulin resistance in fructose-fed mice. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, [*S. l.*], v. 50, n. 6, p. 1035–1043, 2011.

MINEKUS, M. *et al.* A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus. **Food and Function**, [*S. l.*], v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.

MORIMOTO, Nobutaka *et al.* Minocycline inhibits oxidative stress and decreases *in vitro* and *in vivo* ischemic neuronal damage. **Brain Research**, [*S. l.*], v. 1044, n. 1, p. 8–15, 2005.

MOTA, Jéssica C. *et al.* Far from being a simple question: The complexity between *in vitro* and *in vivo* responses from nutrients and bioactive compounds with antioxidant potential. **Food Chemistry**, [*S. l.*], v. 402, n. 15, 2023.

MU, Yu *et al.* Benefits of Puerarin on Metabolic Syndrome and Its Associated Cardiovascular Diseases in Rats Fed a High-Fat/High-Sucrose Diet. **Nutrients**, [*S. l.*], v. 16, n. 9, 2024.

MUKHERJEE, Sayani *et al.* Peripheral and central macrophages in obesity. **Frontiers**, [*S. l.*], v. 14, 2023.

MUKHOPADHYAY, Debanjan *et al.* A Sensitive *In vitro* Spectrophotometric Hydrogen Peroxide Scavenging Assay using 1,10-Phenanthroline. **Free Radicals and Antioxidants**, [*S. l.*], v. 6, n. 1, p. 124–132, 2016.

MYASOEDOVA, Veronika A. *et al.* Matrix metalloproteinases in pro-atherosclerotic arterial remodeling. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, [*S. l.*], v. 123, n. April, p. 159–167, 2018

NADERI, Yazdan *et al.* Cardioprotective effects of minocycline against doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [*S. l.*], v. 158, 2023.

NAKAYAMA, Tomohiro; WANG, Zhaoxia. Inflammation, a link between obesity and cardiovascular disease. **Mediators of Inflammation**, [*S. l.*], v. 2010, 2010.

NASERIBAFROUEI, A. *et al.* Correlation between the human fecal microbiota and depression. **Neurogastroenterology and Motility**, [*S. l.*], v. 26, n. 8, p. 1155–1162, 2014.

OLIVEIRA, Marina C. *et al.* Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **Obesity**, [*S. l.*], v. 21, n. 9, p. 396–406, 2013.

PAKDEECHOTE, Poungrat *et al.* Asiatic acid alleviates hemodynamic and metabolic alterations via restoring eNOS/iNOS expression, oxidative stress, and inflammation in diet-induced metabolic syndrome rats. **Nutrients**, [*S. l.*], v. 6, n. 1, p. 355–370, 2014.

PELLOW, Sharon *et al.* Validation of open" closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, [*S. l.*], v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PENTKOWSKI, Nathan S. *et al*. Anxiety and Alzheimer's disease: Behavioral analysis and neural basis in rodent models of Alzheimer's-related neuropathology. **Neuroscience and Biohavioral Reviews**, [*S. l.*], v. 127, p. 647-568, 2021.

PEREIRA-MAIA, Elene Cristina *et al.* Tetraciclinas e glicilciclinas: uma visão geral. **Química Nova**, [*S. l.*], v. 33, n. 3, p. 700–706, 2010.

PHAM, A. Ninh *et al.* Fenton-like copper redox chemistry revisited: Hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed oxidant production. **Journal of Catalysis**, [*S. l.*], v. 301, p. 54–64, 2013.

PISOSCHI, Aurelia Magdalena; POP, Aneta. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [*S. l.*], v. 97, n. 5, p. 55-74, 2015.

PUTAKALA, Mallaiah *et al.* Cardioprotective effect of Phyllanthus amarus against high fructose diet induced myocardial and aortic stress in rat model. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [*S. l.*], v. 95, p. 1359–1368, 2017.

REIS, Daniel J.; CASTEEN, Emily J.; ILARDI, Stephen S. The antidepressant impact of minocycline in rodents: A systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, [*S. l.*], v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

REMIGANTE, Alessia *et al.* Antioxidant Activity of Quercetin in a H2O2-Induced Oxidative Stress Model in Red Blood Cells: Functional Role of Band 3 Protein. **International Journal of Molecular Sciences**, [*S. l.*], v. 23, n. 19, 2022.

RICH, Lillian; WHITTAKER, Peter. COLLAGEN AND PICROSIRIUS RED STAINING: A POLARIZED LIGHT ASSESSMENT OF FIBRILLAR HUE AND SPATIAL DISTRIBUTION. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, [*S. l.*], v. 22, n. 2, p. 97-104, 2005.

ROBERTS, Christian K. *et al.* Enhanced NO inactivation and hypertension induced by a high-fat, refined-carbohydrate diet. **Hypertension**, [*S. l.*], v. 36, n. 3, p. 423–429, 2000.

ROBERTS, Christian K. *et al.* Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. **Metabolism: Clinical and Experimental**, [*S. l.*], v. 55, n. 7, p. 928–934, 2006.

ROMERO-PEREZ, Diego *et al.* Cardiac Uptake of Minocycline and Mechanisms for *In Vivo* Cardioprotection. **Journal of the American College of Cardiology**, [*S. l.*], v. 52, n. 13, p. 1086–1094, 2008.

SALAMEH, Aida *et al.* Effects of minocycline on parameters of cardiovascular recovery after cardioplegic arrest in a rabbit Langendorff heart model. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, [*S. l.*], v. 42, n. 12, p. 1258–1265, 2015.

SANCHEZ, Kevin; GUERIN, Steven P.; FONKEN, Laura K. Anxiety in obesity: Is neuroinflammation the critical link?. **Brain, Behavior, and Immunity**, [*S. l.*], v. 78, n. January, p. 7–8, 2019.

SANTOS, Carla J. *et al.* Carbohydrate-enriched diet predispose to anxiety and depression-like behavior after stress in mice. **Nutritional Neuroscience**, [*S. l.*], v. 21, n. 1, p. 33–39, 2018.

SAPADIN, Allen N.; FLEISCHMAJER, Raul. Tetracyclines: Nonantibiotic properties and their clinical implications. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [*S. l.*], v. 54, n. 2, p. 258–265, 2006.

SEIDELMANN, Sara B. *et al.* Dietary carbohydrate intake and mortality: a prospective cohort study and meta-analysis. **The Lancet Public Health**, [*S. l.*], v. 3, n. 9, p. e419–e428, 2018.

SHAB-BIDAR, S. *et al.* Metabolic syndrome profiles, obesity measures and intake of dietary fatty acids in adults: Tehran Lipid and Glucose Study. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, [*S. l.*], v. 27, n. SUPPL2, p. 98–108, 2014.

SILVA, Alessandra Oliveira *et al.* Protective Effects of Kefir Against Unpredictable Chronic Stress Alterations in Mice Central Nervous System, Heart, and Kidney. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [*S. l.*], 2022.

SIMPLICIO, Janaina A. *et al.* Contribution of oxidative stress and prostanoids in endothelial dysfunction induced by chronic fluoxetine treatment. **Vascular Pharmacology**, [*S. l.*], v. 73, p. 124–137, 2015.

SINETX, P M *et al.* Increase in glutathione peroxidase activity in erythrocytes from trisomy 21 subjects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [*S. l.*], v. 67, n. 3, p. 910-915, 1975.

SINGH, Tanveer *et al.* Reconnoitering the transformative journey of minocycline from an antibiotic to an antiepileptic drug. **Life Sciences**, [*S. l.*], v. 293, n. 15, 2022.

TSUTSUI, Hiroyuki; KINUGAWA, Shintaro; MATSUSHIMA, Shouji. Oxidative stress and heart failure. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, [*S. l.*], v. 301, n. 6, p. 2181–2190, 2011.

TURNBAUGH, Peter J. *et al.* The effect of diet on the human gut microbiome: A metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. **Science Translational Medicine**, [*S. l.*], v. 1, n. 6, 2009.

VALKO, Marian *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [*S. l.*], v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VALKO, M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, [*S. l.*], v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VAN DER POL, Atze *et al.* Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. **European Journal of Heart Failure**, [*S. l.*], v. 21, n. 4, p. 425-435, 2019.

VENKATESHAN, Suganya *et al.* Antioxidant and anti-hyperlipidemic activity of Hemidesmus indicus in rats fed with high-fat diet. **Avicenna journal of phytomedicine**, [*S. l.*], v. 6, n. 5, p. 516–525, 2016.

VIEL, Emilie C. *et al.* Xanthine oxidase and mitochondria contribute to vascular superoxide anion generation in DOCA-salt hypertensive rats. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, [*S. l.*], v. 295, n. 1, 2008.

VILEIGAS, Danielle Fernandes *et al.* The effects of two types of Western diet on the induction of metabolic syndrome and cardiac remodeling in obese rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, [*S. l.*], v. 92, p. 1–12, 2021.

VINKE, Petra C.; EL AIDY, Sahar; VAN DIJK, Gertjan. The role of supplemental complex dietary carbohydrates and gut microbiota in promoting cardiometabolic and immunological health in obesity: lessons from healthy non-obese individuals. **Frontiers in Nutrition**, [*S. l.*], v. 4, n. 34, 2017.

WANG, Hao Yu *et al.* Implications of Periprocedural Myocardial Biomarker Elevations and Commonly Used MI Definitions After Left Main PCI. **JACC: Cardiovascular Interventions**, [*S. l.*], v. 14, n. 15, p. 1623–1634, 2021.

WANG, Hong Wei *et al.* Inhibition of inflammation by minocycline improves heart failure and depression-like behaviour in rats after myocardial infarction. **PLoS ONE**, [*S. l.*], v. 14, n. 6, 2019.

WANG, Xi; KHALIL, Raouf A. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and vascular disease. **Advances in Pharmacology**, [*S. l.*], v. 81, p. 241–330, 2018.

WEN, Bruges Mee. Stress, adaptation, and disease allostasis and allostatic load. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [*S. l.*], v. 840, p. 33–44, 1998.

WINTER, Gal *et al.* Gut microbiome and depression: What we know and what we need to know. **Reviews in the Neurosciences**, [*S. l.*], v. 29, n. 6, p. 629-643, 2018.

WU, Tianying *et al.* Plasma fluorescent oxidation products as potential markers of oxidative stress for epidemiologic studies. **American Journal of Epidemiology**, [*S. l.*], v. 166, n. 5, p. 552–560, 2007.

XIE, Qunying *et al.* Soyasaponins A1 and A2 exert anti-atherosclerotic functionalities by decreasing hypercholesterolemia and inflammation in high fat diet (HFD)-fed ApoE-/- mice. **Food and Function**, [*S. l.*], v. 11, n. 1, p. 253–269, 2020.

XIONG, Ruo Gu *et al.* The Role of Gut Microbiota in Anxiety, Depression, and Other Mental Disorders as Well as the Protective Effects of Dietary Components. **Nutrients**, [*S. l.*], v. 15, n. 14, 2023.

YABLUCHANSKIY, Andriy *et al.* Matrix metalloproteinase - 9: Many shades of function in cardiovascular disease. **Physiology**, [*S. l.*], v. 28, n. 6, p. 391-403, 2013.

YANG, Quanhe *et al.* Added sugar intake and cardiovascular diseases mortality among us adults. **JAMA Internal Medicine**, [*S. l.*], v. 174, n. 4, p. 516–524, 2014.

YANG, Qi *et al.* Chronic minocycline treatment exerts antidepressant effect, inhibits neuroinflammation, and modulates gut microbiota in mice. [*S. l.*], 237, n. 10, p. 3201–3213, 2020.

YANAGUI, Yoshihiko. Reevaluation of assay methods and establishment of Kit for superoxide sismutase activity. **Analytical Biochemistry,** [*S. l.*], v. 142, n. 2, p. 290-296, 1984.

ZHANG, Weijie *et al.* Antidepressants fluoxetine and amitriptyline induce alterations in intestinal microbiota and gut microbiome function in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. **Translational Psychiatry**, [*S. l.*], v. 11, n. 1, 2021.

ZHANG, Lijun *et al.* Ginkgo Biloba Extract Reduces Cardiac and Brain Inflammation in Rats Fed a HFD and Exposed to Chronic Mental Stress through NF- κ B Inhibition. **Mediators of Inflammation**, [*S. l.*], v. 2022, 2022.

ZHANG, Cai *et al.* Minocycline ameliorates depressive behaviors and neuro-immune dysfunction induced by chronic unpredictable mild stress in the rat. **Behavioural Brain Research**, [*S. l.*], v. 356, n. June 2018, p. 348–357, 2019.

ZICKER, Marina Campos *et al.* Virgin coconut oil is effective to treat metabolic and inflammatory dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, [*S. l.*], v. 63, p. 117–128, 2019.

ANEXO A: CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA- UNIVERSIDADE DE LIMERICK- IRLANDA

UNIVERSITY OF LIMERICK
OLLSCOIL LUIMNIGH

Ollscoil Luimnigh
University of Limerick

Dr John Mulvihill,
Chair of S&E Ethics Committee,
Faculty of Science & Engineering,
University of Limerick,
Limerick, Ireland, V94 T9PX

4th September 2023

Re: **Confirmation of Ethical Approval: Reference Number: 2023_02_01_S&E**

Dear Prof Granato,

This letter is to confirm that Prof. Daniel Granato, School of Engineering in the University of Limerick, has completed all applicable procedures regarding the University of Limerick, Science and Engineering Research Ethics Committee for the project entitled "*Antioxidant, antihemolytic, and antiplatelet activities of bioactive-rich extracts*."

All ethical procedures and aspects of the study were reviewed and approved by the Science & Engineering Ethics Committee in the September 2023 board. Each application is thoroughly reviewed by two separate committee members and is opened for discussion to all members during the committee meeting. The committee, and in particular the reviewers, are satisfied that this project will be conducted according to best practice in accordance with ethical standards in research.

This research will take place between September 2023 to September 2025, with a view for an extension by Chair Decisions prior to the end date. I am free to discuss any queries on any further ethical concerns by emailing John.Mulvihill@ul.ie

Yours sincerely,

4·9·23

John Mulvihill PhD
Principal Investigator Biomedical Engineering
Course Director Biomedical Engineering, BEng & MEng
Chair of Research Ethics Faculty of Science & Engineering,

School of Engineering,
Faculty of Science and Engineering, UL
Bernal Institute and Health Research Instutute
T +353 (0) 61 237719 bernalinstitute.com

UNIVERSITY OF LIMERICK OLLSCOIL LUIMNIGH | Bernal Institute

University of Limerick,
Limerick, V94 T9PX,
Ireland.
Ollscoil Luimnigh,
Luimneach,
V94 T9PX, Éire.
+353 (0) 61 202020

ul.ie

ANEXO B: CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UFMG

Fw: Decisão Final - Aprovado - Protocolo CEUA: 65/2017 (CEUA-UFMG)

De: Nicia Pedreira Soares (niciasoares@yahoo.com.br)

Para: alessandraoliveira.silva@yahoo.com.br

Data: segunda-feira, 28 de dezembro de 2020 12:10 BRT

----- Mensagem encaminhada -----
De: Daniele Aguiar <danieleaguiar@outlook.com>
Para: Nicia aluna <niciasoares@yahoo.com.br>
Enviado: segunda-feira, 5 de junho de 2017 22:19:02 BRT
Assunto: Fwd: Decisão Final - Aprovado - Protocolo CEUA: 65/2017 (CEUA-UFMG)

Enviado do meu iPhone

Início da mensagem encaminhada

De: <ceua@prpq.ufmg.br>
Data: 5 de junho de 2017 16:54:03 BRT
Para: <danieleaguiar@ufmg.br>, <danieleaguiar@outlook.com>
Assunto: Decisão Final - Aprovado - Protocolo CEUA: 65/2017 (CEUA-UFMG)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 65/2017
Título do projeto: Papel da neuroinflamação e leptina nas alterações comportamentais promovidas pelo consumo de dieta palatável rica em carboidratos em camundongos
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Daniele Cristina de Aguiar
Unidade: Instituto de Ciencias Biologicas
Departamento: Departamento de Farmacologia

Situação atual: Decisão Final - Aprovado

Aprovado na reunião do dia 05/06/2017. Validade: 05/06/2017 à 04/06/2022
Belo Horizonte, 05/06/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br