

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Débora Aguirre Gonçalves

**SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICOS FACILITA A MEMÓRIA DE
EXTINÇÃO DE RATOS IDOSOS**

Porto Alegre

2021

Débora Aguirre Gonçalves

**SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICOS FACILITA A MEMÓRIA DE
EXTINÇÃO DE RATOS IDOSOS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientador: Dr. Lucas de Oliveira Alvares

Porto Alegre

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

CIP - Catalogação na Publicação

Aguirre Gonçalves, Débora
Suplementação com probióticos facilita a memória de
extinção de ratos idosos / Débora Aguirre Gonçalves.
-- 2021.
36 f.
Orientador: Lucas de Oliveira Alvares.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. microbiota. 2. envelhecimento. 3. memória. I. de
Oliveira Alvares, Lucas, orient. II. Título.

Débora Aguirre Gonçalves

**SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICOS FACILITA A MEMÓRIA DE
EXTINÇÃO DE RATOS IDOSOS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: 13 de dezembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Dr. José Cláudio Fonseca - UFRGS

Dr. Leandro J. Bertoglio -UFSC

Dr. Lucas de Oliveira Alvares - UFRGS (orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe por todo apoio desde a minha decisão de cursar Biomedicina, à minha irmã pelos lanches e as inúmeras horas me ouvindo ensaiar minhas apresentações. Ao meu primo Augusto, obrigada por todo apoio e companhia quando eu era apenas uma caloura perdida no Campus do Vale e ao meu primo Henrique, agradeço pelo suporte técnico (instalar programas não é meu forte).

À minha amiga Mary, agradeço por tudo que vivemos juntas durante esses anos, especialmente todo o suporte nestes últimos dois anos, por todos os fins de semana estudando ou assistindo nossas séries policiais favoritas. À família da Mary, meu muito obrigado pelo acolhimento e suporte durante todos esses anos. Aos meus amigos Nádia e Borowski, muito obrigado pela companhia nas festas, por aguentar meus dramas.

Aos amigos que a Biomedicina me deu meu muito obrigado Lucas, Bruno, Deila, Simone, Vitória, Liara, Jennifer e Carolina, a vida acadêmica com certeza foi mais divertida tendo vocês ao meu lado. Ao Gabriel Lima, muito obrigado pela parceria, pelas aulas, conselhos e amizade todos esses anos

A caminhada até este trabalho foi longa e de muitos aprendizados e oportunidades, começando pelo meu primeiro laboratório (LABNeT), obrigada a prof^a Patrícia pela oportunidade e às minhas colegas Gabriela, Pricilla e Fernanda. À Jordana Luft, não existem palavras suficientes para agradecer por todos esses anos trabalhando juntas, muito obrigada por tudo. Ao meu atual laboratório, muito obrigada ao meu orientador professor Lucas pela confiança e incentivo em diversos projetos durante esses dois anos de iniciação científica incluindo este trabalho, que não teria acontecido sem o suporte e os ensinamentos dos meus colegas Bruno, Jordana, Mirelle, Angel e Henrique. À Paula Lunardi, muito obrigada por todos os ensinamentos, as conversas e ligações nos fins de semana para conversar sobre as minhas ideias malucas. À Tina, bioterista do Departamento de Biofísica, obrigada pelos ensinamentos, cafezinhos e conselhos.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 JUSTIFICATIVA	12
1.2 OBJETIVOS.....	13
1.2.1 Objetivos gerais.....	13
1.2.2 Objetivos específicos	13
2. ARTIGO	13
3. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	32
REFERÊNCIAS	33
ANEXO A- NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA <i>NEUROBIOLOGY OF LEARNING AND MEMORY</i>	38

RESUMO

A microbiota tem se mostrado crucial para os processos mnemônicos, assim como desequilíbrios nesse sistema podem afetar severamente as memórias de longa duração. O envelhecimento fisiológico pode acarretar distúrbios na microbiota e, conseqüentemente, alterações nos processos de formação, consolidação e manutenção de memórias. Entretanto, ainda existe grande carência na literatura sobre como alterações na microbiota afetam a consolidação e a flexibilização da memória. Assim, pretendemos caracterizar os efeitos de probióticos sobre os processos de flexibilização da memória em ratos *Wistar* idosos. Para tal, utilizamos animais de 3 meses (adultos) e 18 meses (idosos) e ambos foram subdivididos em dois grupos: animais do grupo controle – receberam água destilada - e animais do grupo probiótico – receberam um *pool* de *Lactobacillus*; o tratamento foi crônico, com duração de 14 dias. Para avaliar a memória, utilizamos dois paradigmas comportamentais: o labirinto aquático de Morris (*Water Maze*), que avalia a memória espacial, e a tarefa de condicionamento aversivo ao tom (CAT), que avalia a memória de medo. Na tarefa de memória espacial observamos que, independentemente da idade, os animais foram capazes de aprender a tarefa, bem como flexibilizar a memória espacial, mostrando que a intervenção na microbiota não tem efeito direto sobre a memória neutra. Já na tarefa de memória aversiva, a reposição da microbiota em idosos acarretou a facilitação da memória de extinção. Entretanto, essa facilitação não é observada nos animais jovens adultos, corroborando a hipótese de que o envelhecimento fisiológico aumenta a disbiose e que a reversão desta condição pode diminuir efeitos cognitivos que acompanham o processo de envelhecimento.

Palavras-chave: microbiota; envelhecimento; memória.

ABSTRACT

The gut microbiota has been shown to be crucial for mnemonic processes and imbalances in this system can severely affect long-term memories. Aging can cause disturbances in the microbiota composition and consequently changes in the acquisition, consolidation and maintenance of memories. However, there's a lack of studies about how changes in the gut microbiota affects memory consolidation and flexibilization. So we intend to characterize the probiotics effects on memory flexibility in aged rats. Adults (3 months) or old (18 months) wistar rats were divided into two groups: control – receiving destilated, and probiotic – receiving a pool of *Lactobacillus* chronically for 14 days. To evaluate memory, we used two behavioral paradigms: Morris Water Maze, which evaluates spatial memory, and auditory fear conditioning, that evaluates fear memory. In the spatial task we observed that, regardless the age, animals were able to learn and flexibilize spatial memory, suggesting that microbiota interventions do not affect directly neutral memories. In the other hand, the probiotic treatment in elderly rats enhanced fear extinction memory. At the same time, we did not found the same facilitation in younger rats, corroborating the hypothesis that aging increases dysbiosis and reversing this condition can decrease cognitive effects that follows the aging process.

Keywords: memory; microbiota; aging.

1. INTRODUÇÃO

A memória nos permite armazenar informações importantes, com conteúdos pessoais, mas também nos permite guardar informações que são necessárias para nossa sobrevivência. Para melhor entendimento, podemos separar os processos da memória em etapas distintas envolvidas na formação da memória, são elas: aquisição ou aprendizado, consolidação, evocação, reconsolidação, extinção e esquecimento.

A consolidação sináptica é a etapa em que determinada memória começa o processo de armazenamento no encéfalo imediatamente após a aquisição. Neste período o traço que representa a memória se encontra suscetível a interferências que podem prejudicar ou não a consolidação. Após o término da consolidação, o traço da memória encontra-se menos vulnerável a interferências (Izquierdo & McGaugh, 2000; Rudy, 2015). Na consolidação sináptica diversos processos moleculares são iniciados e esta encontra-se finalizada após algumas horas, estes processos moleculares, tais como síntese de proteínas, levam à alterações na conectividade sináptica em circuitos localizados (Dudai et al., 2015; Kandel et al., 2014). Os estímulos recebidos durante a aquisição da memória podem interferir na consolidação, como por exemplo, memórias com alto teor aversivo podem acelerar o processo de consolidação e tornar o traço mais insensível a alterações (Dudai, 2012). Durante o envelhecimento, os processos envolvidos na consolidação sináptica podem estar prejudicados e, desta forma, estar relacionados a problemas de memória.

A consolidação sistêmica é um processo prolongado em que ocorre uma reorganização das estruturas encefálicas que suportam o traço da memória. Existem duas principais teorias sobre a consolidação sistêmica: a teoria *standard* e a teoria de múltiplos traços. A *standard* propõe que o papel do hipocampo é transitório em uma memória e ele estaria conectando sítios corticais contendo a informação. Com o passar do tempo, o hipocampo não seria mais necessário para a evocação da memória e a qualidade do conteúdo da memória não é afetado, independente da transição de dependência do hipocampo para a não-dependência. Já a teoria de múltiplos traços postula que memórias recentes mediadas pelo hipocampo são diferentes de memórias de longo prazo independentes de hipocampo. Sendo assim, memórias dependentes de hipocampo são mais detalhadas que memórias mediadas por estruturas extra-hipocampais. Para memórias aversivas fortes ou traumáticas também é observado um processo de aceleração na consolidação sistêmica (De Oliveira Alvares et al., 2013; Pedraza et al., 2016; Squire,

2004). O processo de envelhecimento fisiológico também pode causar alterações no conteúdo das memórias dependentes ou não do hipocampo.

Durante a evocação, o traço pode se tornar novamente sensível, desta forma se pode interferir no conteúdo dessa memória, processo que chamamos de reconsolidação, ou pode-se criar uma nova memória, processo denominado extinção (Lee, 2009; Nader & Einarsson, 2010).

A capacidade de atualização da memória é importante para a sobrevivência dos indivíduos, é também importante para a dinâmica de organização neuronal, uma vez que um mesmo traço, ao se tornar lábil, pode ser alterado de forma a adicionar ou remover informações, bem como se pode reforçar ou amenizar a força desta memória (De Oliveira Alvares et al., 2013). Estudos com modelos animais e humanos de diferentes tarefas mostraram que a reconsolidação é uma propriedade fundamental das memórias, esta propriedade também abre a oportunidade de novos enfoques terapêuticos para modificar ou atenuar memórias patológicas (Nader & Einarsson, 2010).

No processo de evocação pode-se também criar uma memória de extinção, uma memória nova que inibe o traço da memória original – o traço original tem seu conteúdo preservado (Bouton, 2002; Furini et al., 2014; Lattal & Abel, 2001). A memória de extinção é mais fraca que a memória original, estando suscetível ao enfraquecimento e gradualmente a memória original retorna, seja com o passar do tempo (recuperação espontânea), seja pela exposição ao contexto original (*reinstatement*) ou pela exposição a um gatilho (*renewal*) (Monfils et al., 2009).

Além dos mecanismos citados, as memórias também podem ser afetadas pelo processo de envelhecimento fisiológico. O envelhecimento fisiológico em humanos é acompanhado de mudanças estruturais estereotípicas e neurofisiológicas no encéfalo, salientando as inúmeras perdas variáveis de cognição (Bishop et al., 2010). Estudos mostraram que diferentes áreas do encéfalo, que interagem para desempenhar as funções cognitivas de ordem superior, possuem uma ativação menos coordenada com o envelhecimento, o que sugere que há uma perda da função integrativa (Bishop et al., 2010). Assim, o processo de envelhecimento está associado a alterações degenerativas multiorgânicas, incluindo os déficits na memória e no aprendizado, principalmente os dependentes do hipocampo. O hipocampo é a região encefálica com participação principal no aprendizado e na memória em mamíferos (Zola-Morgan et al., 1986). No hipocampo, a redução na plasticidade sináptica e da neurogênese estão relacionados com déficits de memória causados pela idade.

A neurogênese é um processo de geração de novos neurônios em redes neuronais já existentes. Em indivíduos adultos esse processo é encontrado no bulbo olfatório – onde está relacionado à renovação dos neurônios ali presentes - e no hipocampo – onde está relacionado principalmente com os processos de memória. Com o envelhecimento, observa-se uma redução na neurogênese que pode estar relacionada com prejuízo na discriminação de informações semelhantes, como objetos parecidos, ou ambientes semelhantes em tarefas de *fear conditioning* em modelos com roedores (Akers et al., 2014; Seib & Martin-Villalba, 2014).

Plasticidade sináptica pode ser definida como mudanças dependentes de atividade na eficácia e força da transmissão sináptica de sinapses pré-existentes (citri). *Long term potentiation* (LTP) e *long term depression* (LTD) são as duas principais formas em que a plasticidade sináptica atua no funcionamento hipocampal. LTP fortalece sinapses e LTD enfraquece as sinapses de forma a prevenir que ocorra a saturação das redes neuronais. Em modelos com roedores, o envelhecimento tem sido associado a prejuízos na LTP hipocampal e uma facilitação na LTD. Juntas, essas alterações podem estar relacionadas a dificuldade de codificar e consolidar novas memórias e facilitar a deleção de memórias antigas (Bettio et al., 2017).

No hipocampo, alterações na morfologia de dendritos e espinhos dendríticos e no número de sinapses podem resultar em disfunção e redução da transmissão sináptica, contribuindo para déficits cognitivos relacionados ao envelhecimento.

O declínio cognitivo é a patologia mais comum na população idosa, sendo possível destacar o declínio cognitivo leve (MCI), consistindo em um estado intermediário entre o envelhecimento fisiológico e o desenvolvimento da doença de Alzheimer (DA), e está associado à perda neuronal no hipocampo, podendo estar relacionado ao estresse oxidativo que leva ao aumento de citocinas inflamatórias. Estes mecanismos envolvidos no envelhecimento e no declínio cognitivo afetam diretamente os processos de memória (Yang et al., 2020). Para uma melhor compreensão do declínio cognitivo, estudos com modelos animais demonstram que os mesmos apresentam dificuldade nas tarefas espaciais, como localização de objetos e labirinto aquático de Morris, que geram memórias dependentes do hipocampo, sendo também observado uma redução do desempenho nas tarefas associadas à memórias de medo (*fear conditioning*), em que o animal apresenta dificuldade na atualização e na extinção dessas memórias aversivas (Yu et al., 2019)– estas memórias envolvem hipocampo e amígdala.

Segundo dados da Organização das Nações Unidas (ONU), até 2050 a população mundial acima de 65 anos terá um aumento de 50%, com isso, surge a necessidade de investigar como podemos reduzir os danos à memória causados pelo envelhecimento fisiológico. Nas últimas décadas a microbiota passou a ser considerada um componente importante na regulação do eixo cérebro-intestino, após a junção de diversos achados que indicavam essa propriedade. Estudos com animais *germ free* demonstram que o encéfalo é afetado na ausência de microbiota, bem como estudos com antibióticos mostram prejuízos no encéfalo, medula espinal e sistema nervoso entérico (SNE) (Heijtz et al., 2011).

A microbiota intestinal consiste em uma população dinâmica e diversa que inclui bactérias, *archeas*, vírus, fungos e protozoários, que mantém uma relação mutualística com o hospedeiro (Botero Palacio et al., 2015). Mais de 10^{14} células bacterianas povoam o trato gastrointestinal (cerca de 10^{10} a 10^{12} UFC/g de conteúdo intestinal), sendo sua maioria localizadas no íleo e no cólon (HARACH, et al., 2015). A composição diversificada da microbiota está associada com a integridade da barreira epitelial e manutenção da homeostase intestinal e imune. Algumas espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são consideradas benéficas, sendo a presença de *Lactobacillus rhamnosus*, por exemplo, associada ao aumento da função da barreira intestinal e também baixos índices de citocinas inflamatórias (Laval et al., 2015). Em contrapartida, o crescimento exacerbado de *Clostridium* é associado à disbiose da microbiota intestinal e ao aumento da permeabilidade intestinal (Nash et al., 2018). A constituição da microbiota se altera durante os diferentes estágios da vida, sendo possível identificar qual o estágio da vida a pessoa se encontra analisando a composição da mesma (Aagaard et al., 2014). Quando envelhecemos, também ocorrem modificações na microbiota, porém elas estão associadas com a densidade de micro-organismos presentes. Sendo assim, estudos sugerem que o desequilíbrio encontrado na microbiota em idosos pode estar associado ao aumento de marcadores inflamatórios, alterações na permeabilidade da barreira do trato gastrointestinal (TGI) e da BHE, bem como ao surgimento e desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (López-Otín et al., 2013). É observado também que as populações de micro-organismos presentes na microbiota humana podem variar de acordo com a dieta da pessoa e entre as diferentes populações (Claesson et al., 2012).

Recentemente, estudos com humanos, como o ELDERMET, reportou que, mudanças na composição da microbiota que estão relacionadas à idade têm implicações

em várias medidas funcionais de saúde, incluindo fragilidade, cognição, depressão e marcadores inflamatórios (Claesson et al., 2011, 2012). Um dos estudos relata que uma dieta diversificada reflete na diversificação da composição do microbioma intestinal. Esses achados foram relacionados à melhor qualidade de vida. Estas alterações também podem contribuir para a inflamação, com a idade avançada podemos observar um aumento no *status* inflamatório e um declínio na imunidade adaptativa (Thevaranjan et al., 2017). A inflamação contribui para a aceleração do processo de envelhecimento e pode aumentar a progressão de doenças relacionadas à idade (XIA, 2016), desde neuropatologias como o Alzheimer (Giunta et al., 2007) até desordens metabólicas e físicas, como doenças cardíacas, osteoporose e diabetes tipo 2 (Boren & Gershwin, 2004). Tanto o envelhecimento como o estresse causam enfraquecimento da integridade e do funcionamento da barreira do TGI e afetam negativamente a permeabilidade da BHE, aumentando potencialmente a inflamação (Montagne et al., 2015). Sendo assim, tratamentos com probióticos e prebióticos têm sido estudados como uma forma de reverter danos causados pelo desbalanço da composição microbiana de um organismo.

Portanto, estudos da regulação da microbiota no eixo cérebro-intestino têm se tornado uma área em expansão e de grande interesse na pesquisa, uma vez que entendendo os mecanismos envolvidos nessa regulação podemos encontrar alguns pontos-chave relacionados ao envelhecimento e até mesmo ao surgimento de doenças neurodegenerativas.

1.1 JUSTIFICATIVA

Os dados recentes sobre a comunicação da microbiota com o sistema nervoso central abriram novas possibilidades de investigação quanto à modulação de muitas funções, sendo assim, esse trabalho tem como objetivo avaliar o papel da microbiota no desempenho da memória espacial e da memória aversiva através de sua modulação em animais idosos, o que pode se mostrar um ponto chave no monitoramento do surgimento de doenças neurodegenerativas.

Nossa hipótese é de que modulando a microbiota de animais idosos, podemos reduzir déficits cognitivos decorrentes do envelhecimento fisiológico e da disbiose causada pela idade.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivos gerais

O objetivo deste projeto é avaliar os efeitos da recomposição da microbiota, realizada a partir do tratamento com probióticos, sobre diferentes memórias em animais idosos.

1.2.2 Objetivos específicos

I- Avaliar se a modulação da microbiota melhora o desempenho de animais idosos na atualização da memória espacial.

II- Avaliar se a modulação da microbiota restaura o aprendizado da memória de extinção em animais idosos.

III- Avaliar se a modulação da microbiota com probióticos leva a uma restauração da composição da mesma em animais idosos.

2. ARTIGO

SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICOS FACILITA A MEMÓRIA DE EXTINÇÃO DE RATOS IDOSOS

Débora Aguirre Gonçalves¹, Lucas de Oliveira Alvares¹

¹Laboratório de Neurobiologia da Memória, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

ABSTRACT

A microbiota tem demonstrado ser importante para a comunicação do eixo cérebro-intestino e um desequilíbrio na sua composição pode afetar a memória. O envelhecimento fisiológico é acompanhado por uma redução na composição da microbiota intestinal e de prejuízos na memória, que podem estar correlacionados. Neste estudo, avaliamos se a suplementação com probióticos, para manutenção da microbiota, leva a uma atenuação do declínio cognitivo observado com a idade avançada. Ratos de 3 e 18 meses foram tratados com um *pool* de *Lactobacillus* por 14 dias e o seu desempenho em duas tarefas distintas de memória foi avaliado. Não foi encontrado efeito do tratamento, independentemente da idade, na tarefa de *Water Maze*. No entanto, na tarefa de condicionamento aversivo ao tom, o tratamento levou a uma facilitação da memória de extinção em animais idosos. A análise da composição da microbiota apontou diferenças entre os animais adultos e idosos. Em conclusão, embora o tratamento com probióticos não tenha levado a uma restauração na microbiota de animais idosos, nossos resultados indicam que sua modulação facilita a memória de extinção.

Palavras chave: memória, envelhecimento, extinção, microbiota

1. INTRODUÇÃO

O processo de envelhecimento fisiológico está associado a alterações degenerativas multiorgânicas, incluindo os déficits na memória e no aprendizado, principalmente as dependentes de hipocampo (Bishop et al., 2010). Sendo que as principais alterações fisiológicas são a redução da neurogênese, alterações nos processos envolvidos na plasticidade sináptica, alterações morfológicas em dendritos e diminuição tanto dos espinhos dentrícticos como no número de sinapses, sugerindo serem as principais causas por trás dos déficits de memória em indivíduos idosos (Akers et al., 2014; Bettio et al., 2017). Em razão disso, o envelhecimento pode acarretar algumas patologias, sendo as mais comuns na população idosa o declínio cognitivo e a doença de Alzheimer, que estão associados à uma elevada perda neuronal no hipocampo (Yang et al., 2020).

Além disso, essas alterações interferem nos processos de memória como: consolidação, evocação, reconsolidação e extinção. Interferências no processo de reconsolidação, em que uma memória evocada volta a ser lábil, podem acarretar em perda não desejada de conteúdo da memória (Monfils et al., 2009). O processo de extinção, memória nova que inibe a expressão de outra memória, é importante principalmente para inibição de memórias aversivas (Furini et al., 2014).

O eixo cérebro-intestino foi proposto como a via pela qual a microbiota intestinal se comunica com o encéfalo e pelo qual ela influencia no comportamento e na cognição (Cryan, O'riordan, et al., 2019). A importância da microbiota em processos neuronais tem sido observada em diversas etapas da vida. Animais *germ free* apresentam déficits cognitivos que podem ser revertidos, dependendo do tempo de vida em que a colonização da microbiota é feita (Chu et al., 2019; Cryan & Dinan, 2012; Heijtz et al., 2011), assim como desequilíbrios na composição da microbiota ao longo da vida podem acarretar em déficits cognitivos (JS et al., 2021; M et al., 2021).

A composição diversificada da microbiota está associada com a integridade da barreira epitelial e manutenção da homeostase intestinal e imune. Algumas espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são consideradas benéficas, sendo a presença de *Lactobacillus rhamnosus*, por exemplo, associada ao aumento da função da barreira intestinal e baixos índices de citocinas inflamatórias (Laval et al., 2015). Com o envelhecimento fisiológico se observa uma disbiose. O principal fator observado é a redução na densidade de micro-organismos presentes, sendo assim, estudos sugerem que o desequilíbrio encontrado na microbiota idosa pode estar associado ao aumento de

marcadores inflamatórios, alterações na permeabilidade da barreira do trato gastrointestinal (TGI) e da barreira hematoencefálica (BHE), bem como pode estar associado ao surgimento de doenças neurodegenerativas (Claesson et al., 2012; López-Otín et al., 2013).

Recentemente, diversos estudos com enfoque na microbiota, utilizando terapias com pré e probióticos, demonstram o papel do microbioma intestinal na regulação da neuroimunidade da meia-idade até a idade avançada, o que tem implicações em intervenções terapêuticas para o combate da neurodegeneração e do declínio cognitivo (Cryan, O, et al., 2019; Yu et al., 2019).

Considerando os crescentes achados com relação à suplementação com probióticos e a melhora cognitiva em idosos, levantamos a hipótese de que o efeito da suplementação com probióticos (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) favorece a flexibilização da memória aversiva e espacial em ratos idosos sem patologias.

2. METODOLOGIA

2.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* de 3 meses (250-350g) e de 18 meses (500-600g), fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação Animal (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais tiveram livre acesso à comida e durante o período de tratamento foram privados de água por cinco horas diariamente durante o ciclo claro (7h/19h). A eutanásia foi realizada após o último dia de experimentos.

Todos os procedimentos realizados foram conduzidos de acordo com diretrizes locais e nacionais de cuidados aos animais (Lei Federal 11.794/2008). Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da universidade.

2.2 Tratamento

Os animais de 18 meses receberam um *pool de Lactobacillus* (*L.casei*, *L.rhamnosus*, *L.acidophilus*, *L.bulgaricus* e *Bifidobacterium bifidum*) administrado diretamente na água dos animais, que tiveram livre acesso após cinco horas de privação de líquidos. Uma cápsula (4×10^8 UFC/mL), diluída em 100 mL de água destilada, totalizando uma dose de 4×10^6 UFC/mL disponibilizada ao animal diariamente. Os

animais controle receberam água destilada. O consumo de água foi medido diariamente e não apresentou diferença (dados não inclusos).

2.3 Extração de DNA das fezes e PCR quantitativo

As fezes dos animais foram coletadas após o último dia de experimento em tubos esterilizados e o material foi armazenado imediatamente a -80°C até sua utilização. O DNA total de 16 animais foi extraído utilizando o kit de extração E.Z.N.A.(OmegaBio-Tek), seguindo as orientações do fornecedor e quantificado utilizando Qubit® 3.0 Fluorometer (Thermo Fischer Scientific).

2.4 Sequenciamento do 16S rRNA

A região V4 do gene 16S rRNA foi amplificada utilizando *primers* 515F e 806R (Caporaso et al., 2012). A reação de PCR foi realizada com um volume total de 50 μL , contendo tampão 1x, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 mM de cada primer, 1,5 mM de MgCl_2 , 2U de Taq DNA polimerase platinum, 10ng de DNA e água para completar o volume. O protocolo utilizado no termociclador (Biorad MyCycler Thermal Cycle) foi: 94°C por 3 min, seguido por 30 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 30 s, e 72°C por 30 s e a extensão final de 72°C por 5 min.

2.5 Condicionamento aversivo ao tom

O aparato consiste em uma caixa automatizada (Insight) com dimensões (33 X 22 X 22 cm). Seu assoalho é composto por uma grade de barras metálicas, com 1 mm de diâmetro cada, distantes 1 cm umas das outras. Nessa grade aplica-se a corrente elétrica (US – estímulo incondicionado) com duração de 1 s. As características dos tons são de 5 kHz com 75 dB (CS – estímulo condicionado) com duração de 30 s. Para o condicionamento é feito o pareamento de cada tom com um choque (CS+US), na sessão de extinção são apresentados apenas os tons (CS).

Foi utilizado um protocolo de treino forte (1mA) que consiste em dois minutos de habituação, três tons pareados com três choques, este protocolo foi realizado no contexto A (paredes listradas, luz alta e essência de baunilha). Já o protocolo de extinção foi realizado 48h depois do treino, no contexto B (paredes escuras e luz desligada), foram apresentados ao animal 20 tons. Para o teste (48h depois da extinção) utilizamos o mesmo contexto e apresentamos três tons.

2.6 Labirinto Aquático de Morris

O aparato consiste em um tanque circular de 1,8m de diâmetro. Uma plataforma transparente (13 cm de diâmetro) foi colocada submersa (1 cm abaixo do nível da água). A tarefa consistiu de 5 ou 7 dias de aquisição, após 14 dias foi realizado o aprendizado reverso. Durante a aquisição, a plataforma ficou fixada na mesma posição, para o aprendizado reverso a plataforma foi colocada no quadrante oposto ao da aquisição. O tanque foi dividido em quatro quadrantes (N, S, L, O) que serviram de ponto de partida onde os animais foram colocados no início de cada *trial* (a ordem das entradas foi decidida aleatoriamente). Uma vez que o rato encontra a plataforma, permanece por 20s antes de ser removido do tanque. Se o animal não encontra a plataforma em 60s, ele é guiado até ela e então permanece ali por 20s antes da sua remoção. A aquisição constituiu de 6 *trials* diários (5 ou 7 dias) e o aprendizado reverso consistiu em 10 *trials* realizados em um dia. A latência para encontrar a plataforma em cada *trial* foi usada como medida de aprendizado.

2.7 Análise de dados da microbiota

A qualidade dos dados resultantes do sequenciamento foi avaliada com o programa FastQC (Simon Andrews, 2020) e filtrados para remoção de possíveis contaminações de adaptadores com o programa Trimmomaticv0.39 (Bolger et al., 2014), após esse processo, as leituras foram processadas pelo pacote DADA2 (Callahan et al., 2016) no R, com limiar para designação taxonômica de 100 *bootstraps*. A designação taxonômica foi feita com a base de dados de sequências 16S Silva v138.1. Após a designação taxonômica os dados foram exportados para o pacote Phyloseq para análises subsequentes. A diversidade α foi calculada pelo pacote Vegan e as análises de Shannon, Simpson, Simpson invertido e Chao1 foram utilizadas, - o teste de Friedman também foi utilizado. A diversidade β foi calculada pelo pacote Phyloseq e as análises aplicadas foram dissimilaridade de Bray-Curtis e UniFrac. Para comparação entre grupos (idade e tratamento) foi utilizada ANOVA e *post hoc* de Tukey no R.

2.8 Análise estatística

Utilizamos ANOVA de duas vias de medidas repetidas com *post hoc* de Tukey para analisar: a curva de extinção, curva de aprendizado do labirinto de Morris e o aprendizado reverso. Já para o teste de extinção utilizamos o Teste t de *Student* independente. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média.

3. RESULTADOS

3.1 Tratamento com probióticos não teve efeito sobre a memória espacial

Já foi demonstrado que animais idosos apresentam o aprendizado, a consolidação e a flexibilização da memória prejudicados em relação a animais adultos (Bishop et al., 2010), assim como as funções hipocâmpais encontram-se alteradas devido a mudanças fisiológicas que ocorrem naturalmente no organismo durante o processo de envelhecimento (Seib & Martin-Villalba, 2014). Levando isso em consideração, levantamos a hipótese que o tratamento crônico com probióticos facilitaria a atualização da memória espacial nos animais idosos.

Para testar a nossa hipótese, treinamos os animais na tarefa do labirinto aquático de Morris e após o último dia de treino os animais foram separados em dois grupos (controle e tratado) – separação feita para não enviesar o experimento –, assim ambos os grupos aprenderam (RM ANOVA fator tempo $p < 0,0001$). Após os quatorze dias de tratamento com probióticos, os animais foram testados para avaliar a flexibilização da memória – aprendizado reverso –, permitindo assim avaliar a evocação e a atualização da memória (fig. 1 A e B). Ambos os grupos foram capazes de aprender a localização nova da plataforma, desta forma o tratamento com probióticos não facilitou o processo de atualização da memória em relação ao grupo controle (fator tempo $p > 0,0001$) (fig. 1 C e D). O nosso resultado sugere que o tratamento com probiótico não interfere na atualização da memória espacial.

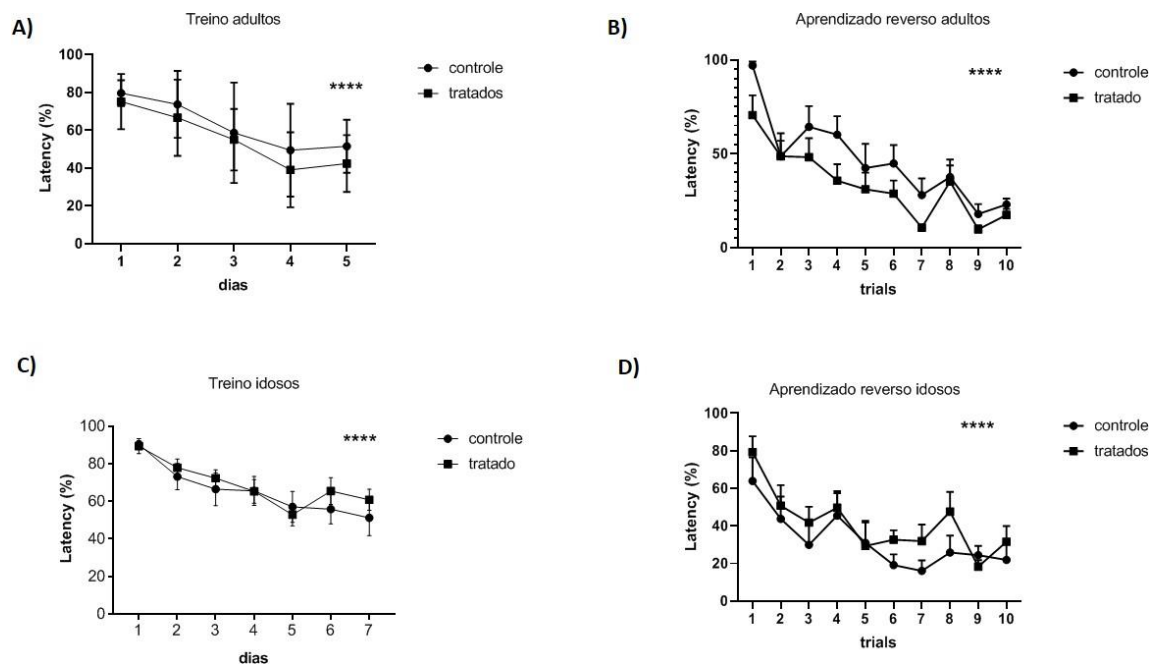


Figura 1 - Probióticos não apresentam interferência na tarefa de memória espacial. (A) Aquisição animais adultos ($F_{(3,60)} = 18,81$ $p < 0,0001$) (B) Aprendizado reverso adultos, não há diferenças de aprendizado entre os grupos ($F_{(9,162)} = 14,80$ $p < 0,0001$). (C) Aquisição animais idosos ($F_{(6,108)} = 12,02$ $p < 0,0001$). (D) Aprendizado reverso animais idosos, não há diferença entre os grupos ($F_{(9,162)} = 7,281$ $p < 0,0001$). **** Fator tempo $p < 0,0001$.

3.2 Tratamento com Probióticos levou a facilitação da memória de extinção em animais idosos

O envelhecimento fisiológico acarreta numa modificação da microbiota e uma redução da flexibilidade cognitiva, levando a dificuldades em modificar comportamentos já estabelecidos (Kaczorowski et al., 2012). Sendo um dos mecanismos de flexibilidade cognitiva a extinção da memória, Chu e colaboradores (2019) demonstraram que animais *germ free* e animais que ingeriram um coquetel de antibióticos apresentam prejuízos no aprendizado da memória de extinção. Em razão disso, levantamos a hipótese de que o tratamento com probióticos facilitaria a extinção em animais idosos.

Após o tratamento crônico, utilizamos um treino forte de 1mA no aparato de condicionamento aversivo ao tom para avaliar a extinção da memória. Logo, realizamos uma sessão única de extinção com 20 tons e num contexto diferente do treino, permitindo assim avaliar a dependência do contexto – *renewal* – como podemos visualizar no protocolo da Figura 2 A. O tratamento não influenciou a sessão de extinção nos animais adultos (fator tratamento $F_{(1,18)} = 1,22$ $p = 0,2835$) e, ambos apresentaram um decaimento

sutil ao longo da sessão (fator tempo $F_{(9,162)} = 5,620$ $p < 0,0001$), mostrando uma interação na ANOVA entre o fator tempo e tratamento ($F_{(9,162)} = 2,255$ $p = 0,0211$). Em seguida – 48h –, foi realizado o teste da memória de extinção e observamos que os animais ainda apresentaram um acentuado comportamento de medo, ou seja, ainda expressam a memória original de medo e o tratamento não facilitou a memória de extinção de um condicionamento forte em ratos adultos ($T_{(18)} = 0,3866$ $p = 0,7036$) (Fig. 2 B e C).

O tratamento com probióticos nos animais idosos facilitou a aquisição da memória de extinção em comparação aos animais do grupo controle, como podemos ver na Figura 2. (RM ANOVA fator tempo $F_{(9,153)} = 6,232$ $p < 0,0001$; fator tratamento $F_{(1,17)} = 6,404$ $p = 0,0216$; entretanto não indicou interação entre os dois fatores $F_{(9,153)} = 1,013$ $p = 0,4325$). No teste, observamos que o grupo tratado expressa um percentual menor de medo em relação ao grupo controle ($T_{(17)} = 2,288$ $p = 0,0352$), sugerindo que o tratamento com probióticos facilita a formação e consolidação da memória de extinção (Fig. 2 D e E). Juntos, esses resultados sugerem que a intervenção na microbiota facilita a memória de extinção apenas em animais idosos.

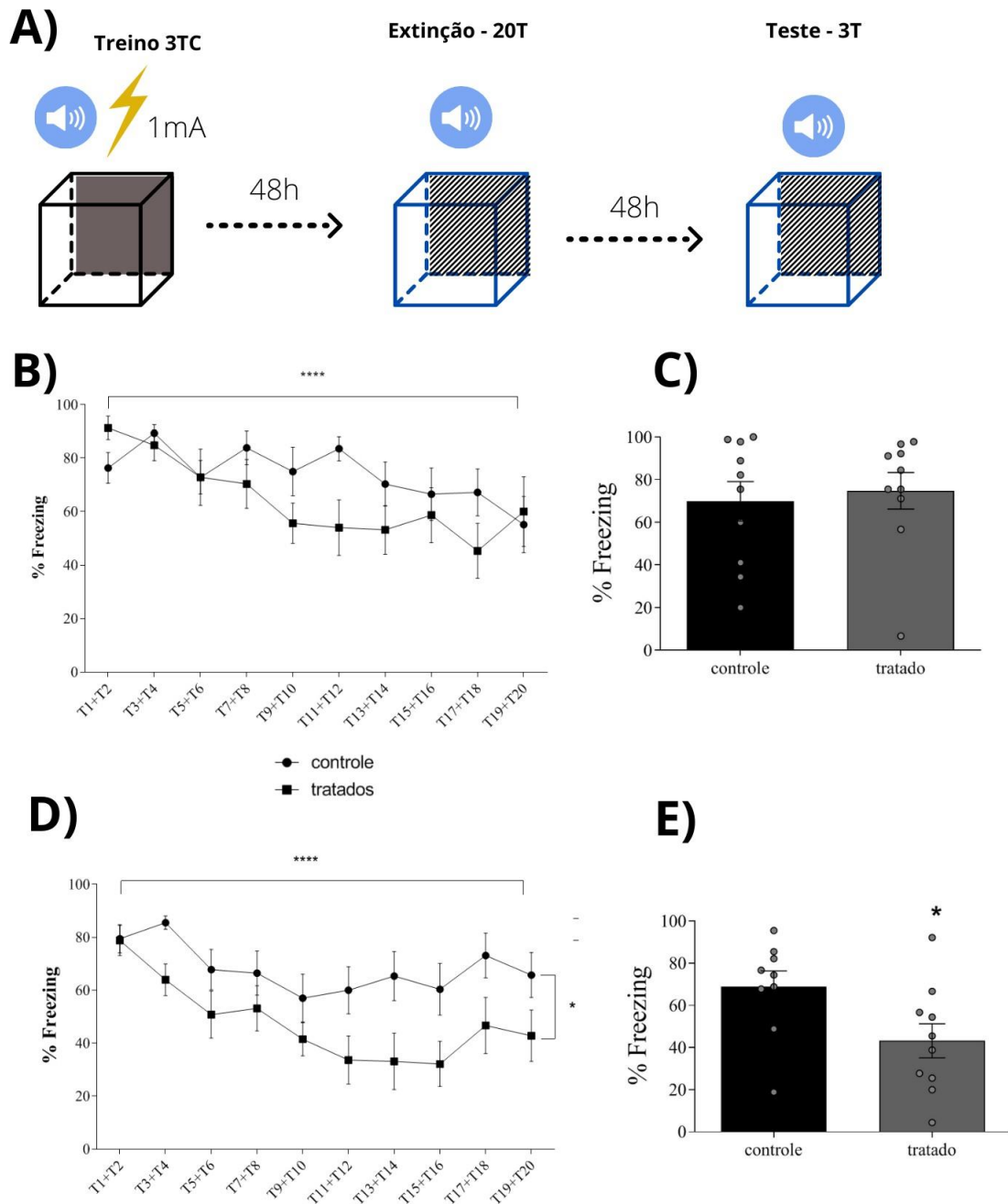


Figura 2 - Probióticos facilitam a extinção. (A) modelo experimental. Animais foram treinados com um protocolo de treino forte e passaram pela extinção 48h depois. (B) Animais adultos não apresentaram redução do freezing durante a sessão de extinção, diferença apenas entre o tempo inicial e final.. (n=10, ****p=0,0001, *p=0,0211). (C) Animais adultos não apresentam redução no *freezing* durante o teste (p=0,7036). (D) Animais idosos apresentam curvas de extinção distintas entre o grupo controle e o grupo tratado (****p=0,0001, *p=0,0216, n=9). (E) Animais idosos tratados apresentam baixo *freezing* no teste da memória de extinção (p=0,0352).

3.3 O tratamento com probióticos não levou a rejuvenescimento da composição da microbiota idosa.

A composição da microbiota intestinal varia de acordo com fatores como dieta, idade, utilização de medicamentos e patologias. Embora não haja uma concordância na composição ideal da microbiota, já se observou diferenças relacionadas à idade, destacando a redução da diversidade e na quantidade de microorganismos ali presentes (Cryan, O, et al., 2019). Essas alterações na composição da microbiota também têm sido correlacionadas com déficits cognitivos, mais especificamente com a memória (G et al., 2018; Romo-Araiza et al., 2018; Romo-Araiza & Ibarra, 2020; WJ et al., 2019; Y et al., 2021; Yu et al., 2019).

Para analisar a microbiota dos animais, coletamos amostras de fezes dos animais adultos e idosos (n=16), comparando o fator de idade (adultos e idosos) e o fator tratamento (grupo controle e grupo tratado).

Os resultados encontrados na análise de α -diversidade estão resumidos na Tabela 1. O índice Chao1 reflete a riqueza das espécies encontradas na microbiota das amostras, esses resultados foram avaliados para os grupos controles adulto ($659,75 \pm 79,83$) e idoso ($679,73 \pm 164,54$) e tratados adulto ($604,25 \pm 222,68$) e idoso ($670,50 \pm 185,95$). Comparando entre as idades, não foram encontradas diferenças significativas (Friedman $p=0,1573$ e Anova de duas vias $p=0,693$). Os testes de Simpson, Simpson Inverso e Shannon avaliam a diversidade microbiana das amostras e novamente, quando os grupos foram comparados entre si, não encontramos diferenças entre controle x tratado ($p>0,05$) e a Anova de duas vias também não mostrou diferença entre os fatores idade e tratamento ($p>0,05$).

A análise da β -diversidade foi utilizada para avaliar as diferenças entre idade e tratamento, utilizando PCoA e Unifrac, os resultados encontrados mostram diferença entre as microbiotas de animais adultos e animais idosos ($p<0,05$), mas não foi encontrada diferença no fator tratamento. (Fig.3)

Nossos resultados sugerem que a modulação da microbiota idosa com probióticos é capaz de levar a alterações nos testes comportamentais, mesmo não levando a uma mudança na sua composição que a aproxime da microbiota adulta. Estes resultados corroboram com dados encontrados na literatura.

Tabela 1 – Probióticos não alteraram α -diversidade.

	Controle - Adulto	Controle - Idoso	Tratament o – Adulto	Tratament o – Idoso	P-value (Friedmand)	P-value (Anova)
Simpson	0.9962 \pm	0.9939 \pm	0.9968 \pm	0.9951 \pm	0.1573	0.642
	0.002	0.007	0.001	0.003		
Inverse Simpson	302.50 \pm	321.67 \pm	341.23 \pm	260.90 \pm	1	0.87
	128.60	179.33	97.06	138.65		
Shannon	6.03 \pm	5.89 \pm	6.04 \pm	5.91 \pm	0.1573	0.861
	0.26	0.76	0.38	0.46		
Chao1	659.75 \pm	679.73 \pm	604.25 \pm	670.50 \pm	0.1573	0.693
	79.83	164.54	222.68	185.95		

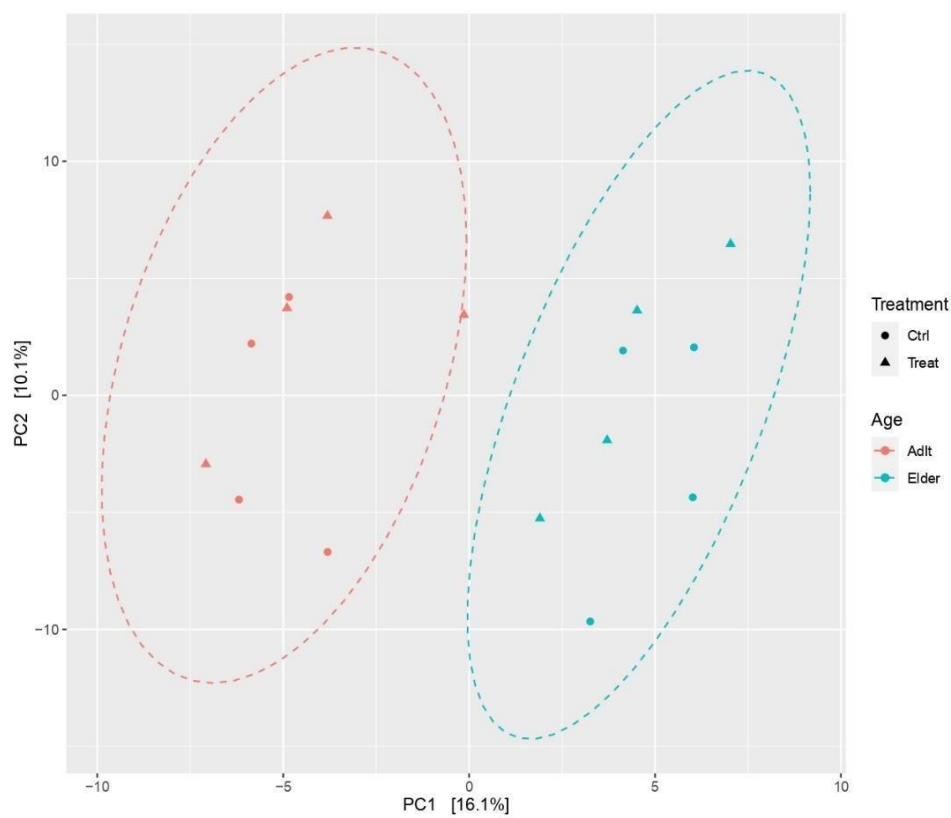


Figura 3 – A microbiota de animais adultos difere de animais idosos.

4. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou os efeitos da suplementação com probióticos sobre a memória de animais idosos. Nossos resultados indicam que a suplementação com probióticos tem efeitos sobre a modulação da memória de medo, mais especificamente da memória de extinção em animais idosos.

Utilizamos a tarefa do labirinto aquático de Morris para avaliar a memória espacial (dependente de hipocampo). Nesta tarefa o animal aprende a localização de uma plataforma submersa em um tanque com água, o teste de aprendizado reverso, em que o animal agora precisa aprender a nova localização da plataforma, avalia a capacidade de flexibilização da memória. Nossos resultados mostram que os animais adultos e idosos são capazes de aprender a tarefa e flexibilizar a memória, independentemente do tratamento com probióticos.

Embora já tenha sido demonstrado que animais idosos apresentam déficits de aprendizado nesta tarefa, e que a suplementação com probióticos reverte esse resultado, os modelos de envelhecimento utilizados não condizem com envelhecimento fisiológico, sendo modelos de senescência acelerada (camundongos SAMP8) e modelos de Alzheimer (Erickson & Barnes, 2003; Fung et al., 2017; Junges et al., 2018; Y et al., 2021; Yu et al., 2019). Outro fator a se considerar é que a microbiota pode não ser necessária para modulação de memórias de conteúdo neutro em condições não-patológicas.

O envelhecimento tem sido relacionado a déficits na memória de medo em protocolos de condicionamento ao contexto e condicionamento ao tom (Chamniansawat & Sawatdiyaphanon, 2018; Magnusson et al., 2002; Romo-Araiza & Ibarra, 2020; Yang et al., 2020). Estudos demonstraram que animais idosos apresentam déficits na memória de extinção (Kaczorowski et al., 2012; Sanders, 2011).

A tarefa de condicionamento aversivo ao tom avalia a memória de medo (dependente da amígdala). Nossos resultados mostram que animais idosos tratados com probióticos apresentam uma facilitação da memória de extinção, sugerindo que a modulação da microbiota pode ter um papel importante na resposta de medo em animais idosos. Os animais adultos, independente do tratamento, não foram capazes de extinguir a memória devido a intensidade do protocolo.

A comunicação da microbiota com o encéfalo (eixo cérebro-intestino) tem sido estudada em diversos modelos, para entender como essa comunicação acontece e qual o papel dela, assim como procura entender como desequilíbrios na microbiota podem levar

a déficits cognitivos. Estudos com animais *germ free* mostraram que a inexistência de microbiota leva a déficits cognitivos que podem não ser revertidos após a fase de amamentação (Chu et al., 2019), bem como a administração de antibióticos para causar desequilíbrios na microbiota levaram a déficits cognitivos em animais (Roy Sarkar et al., 2020). O envelhecimento tem sido associado a mudanças na microbiota que podem estar levando a déficits cognitivos (C & D, 2018; E et al., 2016).

Nossas análises da composição da microbiota de animais adultos e idosos mostrou uma diferença na β -diversidade, que indica diferença entre a microbiota adulta e idosa, consistente com a literatura (Cryan, O, et al., 2019). Porém, o tratamento com probióticos não foi capaz de levar a alterações na composição da microbiota idosa que a tornasse mais parecida com a microbiota adulta. Embora a modulação tenha levado a melhora em resultados comportamentais, os testes utilizados para análise de microbiota não analisaram a nível de gênero ou espécie e, portanto, não encontramos alterações de composição da microbiota que possam explicar esse resultado.

Yang et al., (2020) utilizou camundongos SAMP8 (modelo de senescência acelerada) e encontrou melhoras cognitivas, a suplementação com probióticos também não foi capaz de gerar alterações significativas de α -diversidade, embora mostre efeito de idade na β -diversidade.

Ni et al., (2019), tratou camundongos C57BL/6 idosos com probióticos e encontrou melhora cognitiva nas tarefas de Water Maze e de reconhecimento de objetos, porém a administração de probióticos não levou a alterações nas composições microbianas, sendo possível observar apenas diferenças entre a composição de animais jovens e animais idosos. Esse autor encontrou melhoras significativas em relação a marcadores inflamatórios e estabilidade da barreira intestinal, dados já encontrados em outros estudos e que têm sugerido os possíveis caminhos pelos quais a microbiota se comunica com o cérebro e estaria modulando melhoras cognitivas.

Corroborado com os crescentes dados da literatura, nossos resultados sugerem que a microbiota também modula a cognição, sendo importante nas memórias de medo, e que a suplementação com probióticos auxilia a modular a comunicação do eixo cérebro-intestino em animais idosos. Os mecanismos subjacentes dessa modulação ainda carecem de mais estudos.

5. CONCLUSÃO

Os nossos resultados sugerem que a modulação da microbiota de animais idosos facilita a memória de extinção e não influencia a memória espacial, bem como podem contribuir para as crescentes evidências quanto à participação da microbiota intestinal sobre o comportamento através.

REFERÊNCIAS

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Science Translational Medicine*, 6(237). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>
- Akers, K. G., Martinez-Canabal, A., Restivo, L., Yiu, A. P., De Cristofaro, A., Hsiang, H. L., Wheeler, A. L., Guskjolen, A., Niibori, Y., Shoji, H., Ohira, K., Richards, B. A., Miyakawa, T., Josselyn, S. A., & Frankland, P. W. (2014). Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy. *Science*, 344(6184). <https://doi.org/10.1126/science.1248903>
- Bettio, L. E. B., Rajendran, L., & Gil-Mohapel, J. (2017). The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 79, 66–86. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.04.030>
- Bishop, N. A., Lu, T., & Yankner, B. A. (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*, 464(7288), 529–535. <https://doi.org/10.1038/nature08983>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15):2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- Boren, E., & Gershwin, M. E. (2004). Inflamm-aging: Autoimmunity, and the immune-risk phenotype. In *Autoimmunity Reviews* (Vol. 3, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2004.03.004>
- Botero Palacio, L. E., Delgado Serrano, L., Cepeda Hernández, M. L., Del Portillo Obando, P., & Zambrano Eder, M. M. (2015). The Human Microbiota: the Role of Microbial Communities in Health and Disease. *Acta Biológica Colombiana*, 21(1), 5–15. <https://doi.org/10.15446/abc.v21n1.49761>
- Bouton, M. E. (2002). Context, ambiguity, and unlearning: Sources of relapse after behavioral extinction. In *Biological Psychiatry* (Vol. 52, Issue 10, pp. 976–986). [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01546-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01546-9)
- C, M., & D, W. (2018). The Gut Microbiota and Ageing. *Sub-Cellular Biochemistry*, 90, 351–371. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2835-0_12
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7). <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S. M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J. A., Smith, G., & Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal* 2012 6:8, 6(8), 1621–1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>
- Chamniansawat, S., & Sawatdiyaphanon, C. (2018). Age-Related Memory Impairment Associated With Decreased Endogenous Estradiol in the Hippocampus of Female Rats. *International Journal of Toxicology*, 37(3). <https://doi.org/10.1177/1091581818761653>
- Chu, C., Murdock, M. H., Jing, D., Won, T. H., Chung, H., Kressel, A. M., Tsaava, T., Addorisio, M. E., Putzel, G. G., Zhou, L., Bessman, N. J., Yang, R., Moriyama, S., Parkhurst, C. N., Li, A., Meyer, H. C., Teng, F., Chavan, S. S., Tracey, K. J., ... Artis, D. (2019). The microbiota regulate neuronal function and fear extinction learning. *Nature*, 574(7779), 543–548. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1644-y>
- Claesson, M. J., Cusack, S., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., De Weerd, H., Flannery, E., Marchesi, J. R., Falush, D., Dinan, T., Fitzgerald, G., Stanton, C., Van Sinderen, D., O'Connor, M., Harnedy, N., O'Connor, K., Henry, C., O'Mahony, D., Fitzgerald, A. P., Shanahan, F., ... O'Toole, P. W. (2011). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(SUPPL. 1), 4586–4591. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000097107>
- Claesson, M. J., Jeffery, I. B., Conde, S., Power, S. E., O'connor, E. M., Cusack, S., Harris, H. M. B., Coakley, M., Lakshminarayanan, B., O'sullivan, O., Fitzgerald, G. F., Deane, J., O'connor, M., Harnedy, N., O'connor, K., O'mahony, D., Van Sinderen, D., Wallace, M., Brennan, L., ... O'toole, P. W. (2012). Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*, 488(7410), 178–184. <https://doi.org/10.1038/nature11319>
- Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(10), 701–712. <https://doi.org/10.1038/nrn3346>
- Cryan, J. F., O'riordan, K. J., Cowan, C. S. M., Sandhu, K. V., Bastiaanssen, T. F. S., Boehme, M., Codagnone, M. G., Cussotto, S., Fulling, C., Golubeva, A. V., Guzzetta, K. E., Jaggar, M., Long-Smith, C. M., Lyte, J. M., Martin, J. A., Molinero-Perez, A., Moloney, G., Morelli, E., Morillas, E., ... Dinan, T. G. (2019). The microbiota-gut-brain axis. *Physiological Reviews*, 99(4), 1877–2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>
- Cryan, J. F., O, K. J., M Cowan, C. S., Sandhu, K. V, S Bastiaanssen, T. F., Boehme, M., Codagnone, M. G., Cussotto, S., Fulling, C., Golubeva, A. V, Guzzetta, K. E., Jaggar, M., Long-Smith, C. M., Lyte, J. M., Martin, J. A., Molinero-Perez, A., Moloney, G., Morelli, E., Morillas, E., ... Dinan, T. G. (2019). The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol Rev*, 99, 1877–2013. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>.-The
- De Oliveira Alvares, L., Crestani, A. P., Cassini, L. F., Haubrich, J., Santana, F., & Quillfeldt, J. A. (2013). Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: Exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience*, 244(April), 42–48.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.04.005>

- Dudai, Y. (2012). The restless engram: Consolidations never end. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 35). <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150500>
- Dudai, Y., Karni, A., & Born, J. (2015). The Consolidation and Transformation of Memory. In *Neuron* (Vol. 88, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.004>
- E, B., C, F., S, R., M, S., R, O., S, T., C, C., S, Q., M, S., D, M., M, C., P, B., & M, C. (2016). Gut Microbiota and Extreme Longevity. *Current Biology : CB*, 26(11), 1480–1485. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2016.04.016>
- Erickson, C. A., & Barnes, C. A. (2003). The neurobiology of memory changes in normal aging. *Experimental Gerontology*, 38(1–2), 61–69. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(02\)00160-2](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(02)00160-2)
- Fung, T. C., Olson, C. A., & Hsiao, E. Y. (2017). Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. In *Nature Neuroscience* (Vol. 20, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/nn.4476>
- Furini, C., Myskiw, J., & Izquierdo, I. (2014). The learning of fear extinction. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 47, pp. 670–683). <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.10.016>
- G, Z., N, Y., S, L., N, H., X, F., J, Z., B, Z., L, Y., C, Y., & A, L. (2018). Abnormal gut microbiota composition contributes to cognitive dysfunction in SAMP8 mice. *Aging*, 10(6), 1257–1267. <https://doi.org/10.18632/AGING.101464>
- Giunta, M., Rigamonti, A. E., Scarpini, E., Galimberti, D., Bonomo, S. M., Venturelli, E., Müller, E. E., & Cella, S. G. (2007). The leukocyte expression of CD36 is low in patients with Alzheimer’s disease and mild cognitive impairment. *Neurobiology of Aging*, 28(4). <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.02.002>
- Heijtz, R. D., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Björkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M. L., Forssberg, H., & Pettersson, S. (2011). Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(7). <https://doi.org/10.1073/pnas.1010529108>
- Izquierdo, I., & McGaugh, J. L. (2000). Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. In *Behavioural Pharmacology* (Vol. 11, Issues 7–8). <https://doi.org/10.1097/00008877-200011000-00001>
- JS, G., VV, G., J, L., D, M., & T, B. (2021). The role of the microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric disorders. *Revista Brasileira de Psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)*, 43(3), 293–305. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2020-0987>
- Junges, V. M., Closs, V. E., Nogueira, G. M., & Gottlieb, M. G. V. (2018). Crosstalk between Gut Microbiota and Central Nervous System: A Focus on Alzheimer’s Disease. *Current Alzheimer Research*, 15(13), 1179–1190. <https://doi.org/10.2174/1567205015666180904155908>
- Kaczorowski, C. C., Davis, S. J., & Moyer, J. R. (2012). Aging redistributes medial prefrontal neuronal excitability and impedes extinction of trace fear conditioning. *Neurobiology of Aging*, 33(8), 1744–1757. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.03.020>

- Kandel, E. R., Dudai, Y., & Mayford, M. R. (2014). The molecular and systems biology of memory. In *Cell* (Vol. 157, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.001>
- Lattal, K. M., & Abel, T. (2001). Different requirements for protein synthesis in acquisition and extinction of spatial preferences and context-evoked fear. *Journal of Neuroscience*, 21(15). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-15-05773.2001>
- Laval, L., Martin, R., Natividad, J. N., F Chain, F. C., Miquel, S., Desclée de Maredsous, C., Capronnier, S., Sokol, H., Verdu, E. F., van Hylekama Vlieg, J. E. T., Bermúdez-Humáran, L. G., Smokvina, T., & Langella, P. (2015). *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 and the commensal bacterium *faecalibacterium prausnitzii* A2-165 exhibit similar protective effects to induced barrier hyper-permeability in mice. *Gut Microbes*, 6(1). <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.990784>
- Lee, J. L. C. (2009). Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends in Neurosciences*, 32(8). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.05.002>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. In *Cell* (Vol. 153, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- M, K., M, N. P., J, S., D, S. S., C, B., & D, R. (2021). Metabolomics analysis of microbiota-gut-brain axis in neurodegenerative and psychiatric diseases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 194. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2020.113681>
- Magnusson, K. R., Nelson, S. E., & Young, A. B. (2002). Age-related changes in the protein expression of subunits of the NMDA receptor. *Molecular Brain Research*, 99(1). [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(01\)00344-8](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00344-8)
- Monfils, M. H., Cowansage, K. K., Klann, E., & Ledoux, J. E. (2009). Extinction-Reconsolidation boundaries: Key to persistent attenuation of fear memories. *Science*, 324(5929). <https://doi.org/10.1126/science.1167975>
- Montagne, A., Barnes, S. R., Sweeney, M. D., Halliday, M. R., Sagare, A. P., Zhao, Z., Toga, A. W., Jacobs, R. E., Liu, C. Y., Amezcua, L., Harrington, M. G., Chui, H. C., Law, M., & Zlokovic, B. V. (2015). Blood-Brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron*, 85(2). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.032>
- Nader, K., & Einarsson, E. Ö. (2010). Memory reconsolidation: An update. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1191). <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05443.x>
- Nash, V., Ranadheera, C. S., Georgousopoulou, E. N., Mellor, D. D., Panagiotakos, D. B., McKune, A. J., Kellett, J., & Naumovski, N. (2018). The effects of grape and red wine polyphenols on gut microbiota – A systematic review. In *Food Research International* (Vol. 113). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.019>
- Ni, Y., Yang, X., Zheng, L., Wang, Z., Wu, L., Jiang, J., Yang, T., Ma, L., & Fu, Z. (2019). *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Improves Physiological Function and Cognitive Ability in Aged Mice by the Regulation of Gut Microbiota. *Molecular Nutrition and Food Research*, 63(22). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900603>

- Pedraza, L. K., Sierra, R. O., Boos, F. Z., Haubrich, J., Quillfeldt, J. A., & de Oliveira Alvares, L. (2016). The dynamic nature of systems consolidation: Stress during learning as a switch guiding the rate of the hippocampal dependency and memory quality. *Hippocampus*, *26*(3), 362–371. <https://doi.org/10.1002/hipo.22527>
- Romo-Araiza, A., Gutiérrez-Salmeán, G., Galván, E. J., Hernández-Frausto, M., Herrera-López, G., Romo-Parra, H., García-Contreras, V., Fernández-Presas, A. M., Jasso-Chávez, R., Borlongan, C. V., & Ibarra, A. (2018). Probiotics and Prebiotics as a Therapeutic Strategy to Improve Memory in a Model of Middle-Aged Rats. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *10*(December), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00416>
- Romo-Araiza, A., & Ibarra, A. (2020). Prebiotics and probiotics as potential therapy for cognitive impairment. *Medical Hypotheses*, *134*(July 2019), 109410. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2019.109410>
- Roy Sarkar, S., Mitra Mazumder, P., & Banerjee, S. (2020). Probiotics protect against gut dysbiosis associated decline in learning and memory. *Journal of Neuroimmunology*, *348*. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2020.577390>
- Rudy, J. W. (2015). Variation in the persistence of memory: An interplay between actin dynamics and AMPA receptors. *Brain Research*, *1621*. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.12.009>
- Sanders, M. J. (2011). Context processing in aging: Older mice are impaired in renewal of extinguished fear. *Experimental Aging Research*, *37*(5), 572–594. <https://doi.org/10.1080/0361073X.2011.619874>
- Seib, D. R. M., & Martin-Villalba, A. (2014). Neurogenesis in the Normal Ageing Hippocampus: A Mini-Review. *Gerontology*, *61*(4), 327–335. <https://doi.org/10.1159/000368575>
- Simon Andrews. (2020). Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. In *Soil* (Vol. 5, Issue 1).
- Squire, L. R. (2004). Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, *82*(3). <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.06.005>
- Thevaranjan, N., Puchta, A., Schulz, C., Naidoo, A., Szamosi, J. C., Verschoor, C. P., Loukov, D., Schenck, L. P., Jury, J., Foley, K. P., Schertzer, J. D., Larché, M. J., Davidson, D. J., Verdú, E. F., Surette, M. G., & Bowdish, D. M. E. (2017). Age-Associated Microbial Dysbiosis Promotes Intestinal Permeability, Systemic Inflammation, and Macrophage Dysfunction. *Cell Host and Microbe*, *21*(4). <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.03.002>
- WJ, H., S, S., RM, R., WC, W., WM, G., & N, T. (2019). Modulation of neuroinflammation and memory dysfunction using percutaneous vagus nerve stimulation in mice. *Brain Stimulation*, *12*(1), 19–29. <https://doi.org/10.1016/J.BRS.2018.10.005>
- Y, C., J, X., & Y, C. (2021). Regulation of Neurotransmitters by the Gut Microbiota and Effects on Cognition in Neurological Disorders. *Nutrients*, *13*(6). <https://doi.org/10.3390/NU13062099>

- Yang, X., Yu, D., Xue, L., Li, H., & Du, J. (2020). Probiotics modulate the microbiota–gut–brain axis and improve memory deficits in aged SAMP8 mice. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *10*(3), 475–487. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.07.001>
- Yu, F., Han, W., Zhan, G., Li, S., Xiang, S., Zhu, B., Jiang, X., Yang, L., Luo, A., Hua, F., & Yang, C. (2019). Abnormal gut microbiota composition contributes to cognitive dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mice. *Aging*, *11*(10), 3262–3279. <https://doi.org/10.18632/aging.101978>
- Zola-Morgan, S., Squire, L. R., & Amaral, D. G. (1986). Human amnesia and the medial temporal region: Enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *6*(10). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.06-10-02950.1986>

3. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Encontramos que a suplementação com probióticos facilita a memória de medo em animais idosos, embora não tenha efeito sobre a memória espacial. Nossas análises da composição da microbiota intestinal dos animais utilizados mostraram que existe uma diferença entre a microbiota adulta e idosa – como já reportado na literatura - porém, o tratamento com probióticos não levou a alterações na microbiota idosa que tornasse sua composição mais próxima da microbiota adulta. Comprovando uma de nossas hipóteses.

Nossos dados sugerem que a microbiota tem papel na modulação do comportamento de medo e na memória aversiva e que a modulação da mesma é capaz de levar a alterações nesse sistema. Com isso, outros testes são necessários para elucidar por qual via de comunicação do eixo cérebro-intestino essa modulação está ocorrendo.

Levando em consideração que utilizamos um modelo de envelhecimento fisiológico e que, como consequência da idade, os padrões inflamatórios estão elevados e alteram a permeabilidade da BHE e barreira intestinal, avaliar os padrões inflamatórios e sua possível alteração com a suplementação com probióticos poderia mostrar um dos possíveis mecanismos por trás dos resultados que obtivemos, bem como avaliar a integridade das duas barreiras.

Além disso, nossos resultados comportamentais em relação a facilitação da memória de extinção em animais idosos trazem dados relevantes para a literatura e abrem novas possibilidades, como explorar a duração da memória de extinção em animais idosos e testes com intensidades de treino diferentes.

REFERÊNCIAS

- AAGAARD, Kjersti *et al.* The placenta harbors a unique microbiome. **Science Translational Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 237, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>
- AKERS, Katherine G. *et al.* Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy. **Science**, [s. l.], v. 344, n. 6184, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1248903>
- BETTIO, Luis E.B.; RAJENDRAN, Luckshi; GIL-MOHAPEL, Joana. The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 79, p. 66–86, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.04.030>
- BISHOP, Nicholas A.; LU, Tao; YANKNER, Bruce A. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. **Nature**, [s. l.], v. 464, n. 7288, p. 529–535, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature08983>
- BOLGER, Anthony M.; LOHSE, Marc; USADEL, Bjoern. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**. 2014;30(15):2114-2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170. A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 30, n. 15, 2014.
- BOREN, Eric; GERSHWIN, M. Eric. **Inflamm-aging: Autoimmunity, and the immune-risk phenotype**. [S. l.: s. n.], 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2004.03.004>
- BOTERO PALACIO, Luz Elena *et al.* the Human Microbiota: the Role of Microbial Communities in Health and Disease. **Acta Biológica Colombiana**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 5–15, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.15446/abc.v21n1.49761>
- BOUTON, Mark E. **Context, ambiguity, and unlearning: Sources of relapse after behavioral extinction**. [S. l.: s. n.], 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01546-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01546-9)
- C, Maynard; D, Weinkove. The Gut Microbiota and Ageing. **Sub-cellular biochemistry**, [s. l.], v. 90, p. 351–371, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-13-2835-0_12. Acesso em: 28 set. 2021.
- CALLAHAN, Benjamin J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, [s. l.], v. 13, n. 7, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- CAPORASO, J. Gregory *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal** 2012 6:8, [s. l.], v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>. Acesso em: 30 nov. 2021.
- CHAMNIANSAWAT, Siriporn; SAWATDIYAPHANON, Chattraporn. Age-Related Memory Impairment Associated With Decreased Endogenous Estradiol in the Hippocampus of Female Rats. **International Journal of Toxicology**, [s. l.], v. 37, n. 3, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1091581818761653>

- CHU, Coco *et al.* The microbiota regulate neuronal function and fear extinction learning. **Nature**, [s. l.], v. 574, n. 7779, p. 543–548, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1644-y>
- CLAESSION, Marcus J. *et al.* Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 108, n. SUPPL. 1, p. 4586–4591, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1000097107>
- CLAESSION, Marcus J. *et al.* Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. **Nature**, [s. l.], v. 488, n. 7410, p. 178–184, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature11319>
- CRYAN, John F *et al.* The Microbiota-Gut-Brain Axis. **Physiol Rev**, [s. l.], v. 99, p. 1877–2013, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018.-The>
- DE OLIVEIRA ALVARES, L. *et al.* Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: Exploring the possible biological roles of reconsolidation. **Neuroscience**, [s. l.], v. 244, n. April, p. 42–48, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.04.005>
- DUDAI, Yadin. **The restless engram: Consolidations never end.** [S. l.: s. n.], 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150500>
- DUDAI, Yadin; KARNI, Avi; BORN, Jan. **The Consolidation and Transformation of Memory.** [S. l.: s. n.], 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.004>
- E, Biagi *et al.* Gut Microbiota and Extreme Longevity. **Current biology : CB**, [s. l.], v. 26, n. 11, p. 1480–1485, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2016.04.016>. Acesso em: 28 set. 2021.
- ERICKSON, C. A.; BARNES, C. A. The neurobiology of memory changes in normal aging. **Experimental Gerontology**, [s. l.], v. 38, n. 1–2, p. 61–69, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(02\)00160-2](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(02)00160-2)
- FUNG, Thomas C.; OLSON, Christine A.; HSIAO, Elaine Y. **Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease.** [S. l.: s. n.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nn.4476>
- FURINI, Cristiane; MYSKIW, Jociane; IZQUIERDO, Ivan. **The learning of fear extinction.** [S. l.: s. n.], 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.10.016>
- G, Zhan *et al.* Abnormal gut microbiota composition contributes to cognitive dysfunction in SAMP8 mice. **Aging**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 1257–1267, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/AGING.101464>. Acesso em: 19 out. 2021.
- GIUNTA, M. *et al.* The leukocyte expression of CD36 is low in patients with Alzheimer’s disease and mild cognitive impairment. **Neurobiology of Aging**, [s. l.], v. 28, n. 4, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.02.002>
- HEIJTZ, Rochellys Diaz *et al.* Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 108, n. 7, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1010529108>

IZQUIERDO, I.; MCGAUGH, J. L. **Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation.** [*S. l.: s. n.*], 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00008877-200011000-00001>

JUNGES, Vilma M. *et al.* Crosstalk between Gut Microbiota and Central Nervous System: A Focus on Alzheimer's Disease. **Current Alzheimer Research**, [*s. l.*], v. 15, n. 13, p. 1179–1190, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1567205015666180904155908>

KACZOROWSKI, Catherine C.; DAVIS, Scott J.; MOYER, James R. Aging redistributes medial prefrontal neuronal excitability and impedes extinction of trace fear conditioning. **Neurobiology of Aging**, [*s. l.*], v. 33, n. 8, p. 1744–1757, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.03.020>

KANDEL, Eric R.; DUDAI, Yadin; MAYFORD, Mark R. **The molecular and systems biology of memory.** [*S. l.: s. n.*], 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.001>

LATTAL, K. Matthew; ABEL, Ted. Different requirements for protein synthesis in acquisition and extinction of spatial preferences and context-evoked fear. **Journal of Neuroscience**, [*s. l.*], v. 21, n. 15, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-15-05773.2001>

LAVAL, L. *et al.* Lactobacillus rhamnosus CNCM I-3690 and the commensal bacterium faecalibacterium prausnitzii A2-165 exhibit similar protective effects to induced barrier hyper-permeability in mice. **Gut Microbes**, [*s. l.*], v. 6, n. 1, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.990784>

LEE, Jonathan L.C. Reconsolidation: maintaining memory relevance. **Trends in Neurosciences**, [*s. l.*], v. 32, n. 8, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.05.002>

LÓPEZ-OTÍN, Carlos *et al.* **The hallmarks of aging.** [*S. l.: s. n.*], 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>

MAGNUSSON, Kathy Ruth; NELSON, Scott Edward; YOUNG, Anne B. Age-related changes in the protein expression of subunits of the NMDA receptor. **Molecular Brain Research**, [*s. l.*], v. 99, n. 1, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(01\)00344-8](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00344-8)



MONFILS, Marie H. *et al.* Extinction-Reconsolidation boundaries: Key to persistent attenuation of fear memories. **Science**, [*s. l.*], v. 324, n. 5929, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1167975>

MONTAGNE, Axel *et al.* Blood-Brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. **Neuron**, [*s. l.*], v. 85, n. 2, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.032>

NADER, Karim; EINARSSON, Einar Örn. **Memory reconsolidation: An update.** [*S. l.: s. n.*], 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05443.x>

NASH, Victoria *et al.* **The effects of grape and red wine polyphenols on gut microbiota – A systematic review.** [*S. l.: s. n.*], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.019>

NI, Yinhua *et al.* Lactobacillus and Bifidobacterium Improves Physiological Function

- and Cognitive Ability in Aged Mice by the Regulation of Gut Microbiota. **Molecular Nutrition and Food Research**, [s. l.], v. 63, n. 22, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900603>
- PEDRAZA, Lizeth K. *et al.* The dynamic nature of systems consolidation: Stress during learning as a switch guiding the rate of the hippocampal dependency and memory quality. **Hippocampus**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 362–371, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/hipo.22527>
- ROMO-ARAIZA, Alejandra *et al.* Probiotics and Prebiotics as a Therapeutic Strategy to Improve Memory in a Model of Middle-Aged Rats. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. December, p. 1–15, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00416>
- ROMO-ARAIZA, Alejandra; IBARRA, Antonio. Prebiotics and probiotics as potential therapy for cognitive impairment. **Medical Hypotheses**, [s. l.], v. 134, n. July 2019, p. 109410, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2019.109410>
- ROY SARKAR, Suparna; MITRA MAZUMDER, Papiya; BANERJEE, Sugato. Probiotics protect against gut dysbiosis associated decline in learning and memory. **Journal of Neuroimmunology**, [s. l.], v. 348, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2020.577390>
- RUDY, Jerry W. Variation in the persistence of memory: An interplay between actin dynamics and AMPA receptors. **Brain Research**, [s. l.], v. 1621, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.12.009>
- SANDERS, Matthew J. Context processing in aging: Older mice are impaired in renewal of extinguished fear. **Experimental Aging Research**, [s. l.], v. 37, n. 5, p. 572–594, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/0361073X.2011.619874>
- SEIB, D.   R.M.; MARTIN-VILLALBA, Ana. Neurogenesis in the Normal Ageing Hippocampus: A Mini-Review. **Gerontology**, [s. l.], v. 61, n. 4, p. 327–335, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000368575>
- SIMON ANDREWS. **Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data**. [S. l.: s. n.], 2020.
- SQUIRE, Larry R. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *In:* , 2004. **Neurobiology of Learning and Memory**. [S. l.: s. n.], 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.06.005>
- THEVARANJAN, Netusha *et al.* Age-Associated Microbial Dysbiosis Promotes Intestinal Permeability, Systemic Inflammation, and Macrophage Dysfunction. **Cell Host and Microbe**, [s. l.], v. 21, n. 4, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.03.002>
- WJ, Huffman *et al.* Modulation of neuroinflammation and memory dysfunction using percutaneous vagus nerve stimulation in mice. **Brain stimulation**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 19–29, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BRS.2018.10.005>. Acesso em: 28 set. 2021.
- Y, Chen; J, Xu; Y, Chen. Regulation of Neurotransmitters by the Gut Microbiota and Effects on Cognition in Neurological Disorders. **Nutrients**, [s. l.], v. 13, n. 6, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/NU13062099>. Acesso em: 28 set. 2021.

YANG, Xueqin *et al.* Probiotics modulate the microbiota–gut–brain axis and improve memory deficits in aged SAMP8 mice. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 475–487, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.07.001>

YU, Fan *et al.* Abnormal gut microbiota composition contributes to cognitive dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mice. **Aging**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 3262–3279, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/aging.101978>

ZOLA-MORGAN, S.; SQUIRE, L. R.; AMARAL, D. G. Human amnesia and the medial temporal region: Enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 6, n. 10, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/jneurosci.06-10-02950.1986>

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA *NEUROBIOLOGY OF LEARNING AND MEMORY*

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Experimental

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.