

PARTE I

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Dissertação de Mestrado

**Alterações na Microbiota Intestinal de ratos Wistar  
Obesos e Não-Obesos através da administração do  
extrato comercial de Guaraná (*Paullinia cupana*).**

Alexandre Kleber Silveira

Orientador: Prof. José Cláudio Fonseca Moreira

Porto Alegre

2018

## PARTE I

### CIP - Catalogação na Publicação

Silveira, Alexandre Kleber  
Alterações na Microbiota Intestinal de ratos  
Wistar Obesos e Não-Obesos através da administração  
do extrato comercial de Guaraná (*Paullinia cupana*).  
/ Alexandre Kleber Silveira. -- 2018.  
61 f.  
Orientador: José Cláudio Fonseca Moreira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Microbiota. 2. Obesidade. 3. Bioinformática.  
4. Estresse Oxidativo. 5. Guaraná. I. Moreira, José  
Cláudio Fonseca, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com  
os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## PARTE I

### **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente aos meus pais e ao meu irmão pelo amor e aprendizado durante toda a vida e também pelo apoio incondicional durante esses dois primeiros anos fora de casa.

Ao meu orientador e amigo Prof. Zé Claudio, pelos ensinamentos dentro e fora do laboratório, esse trabalho só foi possível devido à sua dedicação ao longo de toda minha trajetória como pesquisador.

Aos amigos do laboratório 32, que me apoiaram nos bons e maus momentos e principalmente suportaram o meu mau humor durante as manhãs.

Agradeço aos meus amigos que me ajudaram nos momentos de foco e descontração ao longo do mestrado, sem esse apoio não seria possível chegar até aqui.

Agradeço à banca avaliadora desse trabalho pela disponibilidade e atenção.

Aos funcionários da secretaria do PPG, pela amizade e profissionalismo.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Muito obrigado!

# PARTE I

## Sumário

<b>PARTE I</b> .....	1
Resumo.....	3
Abstract.....	4
Lista de Abreviaturas.....	5
1. Introdução.....	6
1.1 A Relação da Microbiota com o Hospedeiro.....	6
1.2A Obesidade e a Dieta Ocidental.....	8
1.3 O Guaraná e seu Uso Popular.....	9
2. Objetivo.....	12
2.1 Objetivos específicos.....	11
<b>PARTE II</b> .....	12
3. Material e Métodos.....	13
3.1 Os animais.....	13
3.2 Dieta e Tratamento.....	13
3.3 Dieta Obesogênica Padrão.....	13
3.4 Extrato de Sementes do Guaraná e Dose utilizada.....	14
3.5 Análises do Perfil Oxidativo.....	15
3.6 Citocinas inflamatórias.....	17
3.7 Coleta Cecal.....	17
3.8 Extração do DNA.....	17
3.9 Amplificação do DNA.....	17
3.10 Sequenciamento de alto desempenho dos produtos de amplificação dos genes de interesse.....	17
3.11 Análise de sequenciamento de alto desempenho.....	18
3.12 Descarte de resíduos.....	18
3.13 Análise estatística.....	19
4. Resultados.....	21
4.1 Ganho de peso.....	21
4.2 Peso das gorduras.....	21
4.3 Consumo de ração.....	21
4.4 Atividade das Enzimas Antioxidantes.....	22
4.4.1 Fígado.....	22
4.4.2 Intestino Delgado.....	24
4.4.3 Rim.....	27
4.5 Citocinas Proinflamatórias.....	29
4.6 Microbiota Intestinal.....	29
4.6.1 Número de leituras.....	29
4.6.2 Diversidade Bacteriana.....	29
4.6.3 Filos bacterianos.....	30
4.6.3.1 <i>Bacteroidetes</i> .....	31
4.6.3.2 <i>Firmicutes</i> .....	31
4.6.3.3 Relação <i>Bacteroidetes</i> / <i>Firmicutes</i> .....	32

## PARTE I

4.6.3.4	<i>Proteobacteria</i> .....	32
4.6.4	Famílias bacterianas.....	33
4.6.4.1	<i>Bifidobacteriaceae</i> .....	33
4.6.4.2	<i>Enterobacteriaceae</i> .....	33
4.6.4.3	<i>Lactobacillaceae</i> .....	33
4.6.4.4	<i>Rumnicocaceae</i> .....	33
4.6.4.5	<i>Bacteroidaceae</i> .....	33
4.6.4.6	Prevotellaceae.....	33
4.6.5	Gêneros bacterianos.....	36
4.6.5.1	<i>Bifidobacterium</i> .....	36
4.6.5.2	<i>Lactobacillus</i> .....	36
4.6.5.3	<i>Mucispirillum</i> .....	36
4.6.5.4	<i>Escherichia</i> .....	36
4.6.5.5	<i>Bacteroides</i> .....	36
4.6.5.6	<i>Prevotella</i> .....	37
4.6.6	Análise de landscape pelo software ViaComplex.....	39
4.6.7	Clusterização.....	40
4.6.8	Análise de Componentes Principais.....	40
PARTE III	.....	42
5.	Discussão.....	42
5.1	Utilização da Dieta Padronizada de Cafeteria.....	42
5.2	Consumo Alimentar e Ganho de Peso.....	42
5.3	Regulação Redox e Inflamatória.....	44
5.4	Disbiose da Microbiota Intestinal.....	47
6.	Conclusão.....	52
7.	Perspectivas.....	53
8.	Referências .....	54

## PARTE I

O guaraná (*Paullinia cupana*) é uma planta nativa da América do Sul, e suas sementes tem sido utilizadas por tribos amazônicas desde antes da colonização. O extrato de guaraná é consumido popularmente nos dias de hoje, entretanto pouco se sabe sobre a relação desse extrato com a microbiota intestinal. A microbiota possui um papel central na absorção de nutrientes da dieta e na regulação do metabolismo energético, sendo modificada na obesidade. A microbiota intestinal também é afetada pelo consumo de compostos vegetais, sendo muitas vezes regulada positivamente por dietas ricas em polifenóis. Todavia, o consumo de extratos vegetais pode gerar um desfecho tóxico, assim como alterações negativas na microbiota. O efeito de extratos ricos em compostos secundários deve ser estudado individualmente. Nesse trabalho avaliamos as alterações no ecossistema intestinal causadas pelo extrato comercial de sementes do Guaraná em animais saudáveis e no contexto da obesidade. Induzimos a obesidade em animais através de uma dieta que mimetiza a dieta ocidental, caracterizada por uma maior quantidade de gordura, sal e açúcar refinado, e uma menor quantidade de fibras. Os animais também foram submetidos ao tratamento com um extrato comercial de Guaraná, cafeína ou salina. A disbiose intestinal foi medida no conteúdo cecal através da amplificação e sequenciamento da porção ribossomal 16S. Também foi medida a atividade enzimática no fígado, rins e intestino delgado, assim como a quantidade de citocinas pró-inflamatórias no soro. A dieta obesogênica gerou um aumento no ganho de peso e no acúmulo de gordura dos animais comparada com a dieta Chow. Tanto o Guaraná quanto a cafeína não foram capazes de reverter o ganho de peso e o acúmulo de gordura. Observamos uma menor atividade da enzima GPx no rim e no intestino delgado dos animais que receberam a dieta obesogênica comparada com a dieta Chow, independente do tratamento com guaraná. Também observamos a diminuição da atividade da enzima CAT no rim nos animais que receberam guaraná, independente da dieta. A dieta obesogênica induziu alterações na microbiota intestinal semelhantes às da obesidade, diminuindo a proporção de *Bacteroidetes* sobre *Firmicutes*, aumentando o gênero *Mucispirillum* e diminuindo os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Os tratamentos com guaraná e cafeína na dieta Chow diminuíram a proporção B/F, assim como o gênero *Bifidobacterium*. Observamos um aumento no filo *Proteobacteria* nos animais do grupo controle obeso. Esse aumento foi revertido pelo tratamento com guaraná. Analisando os gráficos de clusterização e *landscape*, observamos uma maior distância entre a microbiota dos animais que receberam dietas diferentes do que a dos animais que receberam tratamentos diferentes. Os tratamentos com guaraná ou cafeína modificaram o ecossistema intestinal, mas sem a capacidade de diminuir o acúmulo de gordura ou o ganho de peso. A maior alteração na microbiota foi devido à dieta obesogênica e não aos tratamentos, mostrando que os efeitos anti-obesogênicos do guaraná observados em outros estudos provavelmente não são via microbiota intestinal.

## PARTE I

Guarana (*Paullinia cupana*) is a plant native of South America, and its seeds have been used by Amazonian tribes since before colonization. Guarana extract is consumed popularly today, however little is known about the interactions of this extract with the intestinal microbiota. The gut microbiota plays a central role in the absorption of nutrients from the diet and in the regulation of energy metabolism, being altered in obesity. The intestinal microbiota is also affected by the consumption of plant metabolites and is often regulated positively by diets rich in polyphenols. However, the consumption of plant extracts can generate a toxic outcome, as well as negative changes in the microbiota. Therefore, the effect of plant extracts should be studied individually. In this work, we evaluated the changes in the intestinal ecosystem caused by the administration of a commercial extract of Guaraná seeds in healthy animals and in the context of obesity. We induced obesity in animals through a diet that mimics the western diet, characterized by a higher amount of fat, salt and refined sugar, and a smaller amount of fiber. The animals were also treated with a commercial extract of Guarana, caffeine or saline. Intestinal dysbiosis was evaluated by cecal content, amplification and sequencing of the 16S ribosomal portion. The antioxidant enzymatic activity of the liver, kidney and small intestine was measured as well as the concentration of pro-inflammatory cytokines in the serum. The obesogenic diet increased the weight gain and fat accumulation of the animals compared to the Chow diet. Both Guarana and caffeine were unable to reverse weight gain and fat accumulation. We observed a lower activity of the Glutathione Peroxidase enzyme in the kidney and small intestine in the animals that received obesogenic diet compared to the Chow diet, regardless of the treatment. We also observed the decrease of Catalase enzyme activity in the kidney of animals that received Guarana, regardless of diet. The obesogenic diet induced changes in the intestinal microbiota similar to other works in literature, reducing the proportion of Bacteroidetes/Firmicutes (B/F), increasing the genus *Mucispirillum* and decreasing the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. Guarana and caffeine treatments in the Chow diet decreased the B/F ratio, thus the *Bifidobacterium* genus. We observed an increase in the phylum *Proteobacteria*, in the animals of the Obese Control group. This increase in the phylum *Proteobacteria*, was reversed by the treatment with Guaraná. Analyzing the phylogenetic proximity charts and landscape, we observed a greater distance between the animals that received different diets than animals that received different treatments. Treatments with guarana or caffeine modified the intestinal ecosystem, but without the ability to decrease fat accumulation or weight gain. The major change in the microbiota was due to the obesogenic diet and not to the treatments, showing that the antiobese effects of guarana observed in other studies probably are not via intestinal microbiota.

## PARTE I

Lista de abreviaturas:

**CAT: Enzima Catalase**

**SOD: Enzima Superóxido Dismutase**

**GPx: Enzima GlutathionaPeroxidase**

**GST: Enzima Glutathiona-S-transferase**

**LPS: Lipopolissacarídeo**

**IMC: Índice de massa corpórea**

**GF: Animais germ-free**

**SCFA: Ácidos graxos de cadeia curta**

**B/F: Razão da abundância dos filosBacteroidetes/Firmicutes**

**PBS: Tampão fosfato-salino**



## 1. Introdução

### 1.1 A Relação da Microbiota com o Hospedeiro

A relação entre microorganismos e seus hospedeiros é tão antiga quanto o surgimento da vida multicelular. A oxidação de moléculas orgânicas para produção de ATP na mitocôndria e a síntese de açúcares utilizando a energia fotoelétrica no cloroplasto são dois fenômenos essenciais em toda organização da vida como conhecemos hoje e ambos tiveram origem na interação endossimbiótica (Dyall *et al.*, 2004). Essa coevolução entre a microbiota e seus hospedeiros é extremamente importante no sucesso evolutivo das espécies, ganhando atenção dos pesquisadores de diversas áreas nos últimos anos. Estudos da microbiota humana tem crescido vertiginosamente, principalmente aqueles relacionados com as populações de bactérias intestinais, que compõem a maioria da nossa microbiota.

Análises da microbiota intestinal mostram que essa é composta principalmente por bactérias, mas também outros microorganismos como fungos, archeas e vírus. A quantidade de bactérias presentes no corpo humano é aproximadamente  $10^{13}$ , o que seria equivalente ao número de células presentes em nosso corpo (Sender *et al.*, 2016). Esse elevado número de células microbianas nos obriga a pensar nas relações entre bactérias e seu hospedeiro. Se levarmos em conta ainda a quantidade de genes presentes no genoma desses microorganismos, podemos observar que existem 100 genes advindos da microbiota para cada 1 gene no nosso genoma (Gill *et al.*, 2006). Esses dados nos levam à uma nova interpretação de diversas doenças e condições, onde muitas vezes é válido considerar o corpo humano não como um único indivíduo, mas como um superorganismo que é composto e afetado por trilhões de microorganismos.

Em 1855, Louis Pasteur já preconizava que organismos que não possuíam bactérias não seriam capazes de se desenvolver corretamente devido à essa relação de sinergia entre o hospedeiro e a sua microbiota. Muitos anos após podemos analisar os efeitos de um desenvolvimento sem o

## PARTE I

estímulo da microbiota. O papel da microbiota se tornou evidente graças à modelos com animais ausentes de microbiota. Os chamados animais germ-free (GF) são criados em condições estéreis e não possuem nenhum microorganismo.

Animais GF são resistentes à obesidade induzida pela dieta, ressaltando o papel da microbiota na absorção e manejo de nutrientes alimentares (Backhed *et al.*, 2007). O desenvolvimento na ausência de microorganismos simbiotes também causa problemas no desenvolvimento do sistema nervoso central, na maturação do sistema imune e uma maior permeabilidade da barreira hematoencefálica (Grenham *et al.*, 2011; Braniste *et al.*, 2014). Estudos com animais GF tem mostrado o quão essencial é a microbiota para o desenvolvimento e saúde do hospedeiro (Luczynski *et al.*, 2016).

Sabemos que as bactérias do intestino possuem um papel regulador na relação com a alimentação. Populações em locais diferentes apresentam perfis microbianos diferentes, como encontradas nas crianças de Burkina-faso comparadas as da Europa. Essas variações se devem aos diferentes hábitos alimentares dessas populações. Dietas ricas em carboidratos não solúveis tendem a aumentar o número de bactérias do gênero *Prevotella*, já que alguns dos microorganismos desse gênero tem o material enzimático para digerir as fibras não solúveis. Já na típica dieta ocidental, rica em proteína e gordura animal, temos uma maior presença de bactérias do gênero *Bacteroides* (De Filippo *et al.*, 2010).

As alterações mais estudadas na microbiota intestinal são as decorrentes de modificações na dieta. Bactérias intestinais liberam produtos no lúmen intestinal que, muitas vezes, possuem um efeito regulador no organismo hospedeiro. Esse efeito pode ser positivo como é o caso dos ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) (Morrison e Preston, 2016), ou negativo como é o caso dos lipopolissacarídeo (LPS) derivado da membrana de bactérias gram-negativas (Beutler, 2009).

É possível, então, observar que a microbiota intestinal está presente desde o início do nosso desenvolvimento, e que a relação entre microorganismos e hospedeiros começou milhões de anos atrás. A microbiota

## PARTE I

é regulada pela dieta e também regula a forma como absorvemos os nutrientes, além de maturar o sistema imune e o permitir o desenvolvimento correto das barreiras intestinal e hematoencefálica.

### **1.2 A Obesidade e a Dieta Ocidental**

A luta por alimento acompanha todos os seres heterótrofos, onde é necessário consumir nutrientes, para que possam utilizar sua energia no conjunto de reações do organismo. Essa constante luta pelo alimento selecionou receptores para alimentos ricos em energia potencial. Quando provamos um alimento gorduroso, o sinal que o sistema gastrointestinal e nervoso recebe é de que estamos prestes a receber moléculas cujas ligações podem ser utilizadas, transferindo sua energia para outros processos metabólicos. Esses receptores dão um feedback positivo ao organismo quando este consome alimentos calóricos, gerando uma relação não apenas de necessidade, mas principalmente de prazer ao nos alimentarmos (Breslin, 2013). Devido à essa relação, alimentos feitos com o intuito de serem super palatáveis são consumidos em níveis muito acima das necessidades fisiológicas. Esse excesso no consumo é a principal causa do sobrepeso e obesidade na sociedade humana (Haslam e James, 2005).

O problema da obesidade frente à evolução biológica consiste em algo nunca visto. Durante o curso evolutivo da nossa espécie, podemos imaginar que conjuntos gênicos que favoreciam o acúmulo eficiente de gordura e o aproveitamento máximo do alimento foram selecionados. A mudança no método de obtenção de alimento, advinda da revolução agrícola, trouxe novas perspectivas na organização da sociedade. A busca por comida se torna algo mais previsível e fácil em um curto período de tempo. Esse período não é

## PARTE I

suficiente para que haja uma adaptação no nosso metabolismo, gerando o problema da obesidade.

O aumento no número de pessoas obesas nos últimos anos tem sido algo preocupante em todos os países desenvolvidos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, os índices de obesidade praticamente dobraram de 1980 até agora. Recentemente tivemos um aumento expressivo no número de pessoas com sobrepeso no Brasil. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no ano de 2003 aproximadamente 40% da população apresentava sobrepeso (IMC acima de 25kg/m<sup>2</sup>), já no ano de 2013 a proporção se aproxima de 57%. Esse grande aumento tem relação com os novos hábitos alimentares desenvolvidos, principalmente, nos países ocidentais. Nos Estados Unidos da América o índice de pessoas com sobrepeso se aproxima dos 70% no mesmo período, segundo dados do *Centers for Disease Control and Prevention*.

A obesidade é um quadro clínico caracterizado pelo excesso de gordura no corpo. São usados índices de massa corporal para diagnosticar a obesidade, onde um indivíduo com mais de 30kg/m<sup>2</sup> é considerado obeso. Porém, hoje sabemos que a obesidade é uma doença multifatorial, onde a homeostase de um organismo com excesso de gordura difere da de um organismo saudável. O grande problema da obesidade não é o acúmulo de gordura em si, mas a quantidade de comorbidades que a acompanham. Hipócrates na antiga Grécia já havia escrito que "A corpulência não é somente uma doença em si, mas o prenúncio de outras" (Harvey, 1872). Já 2005 a obesidade ultrapassou o cigarro como um problema a ser combatido que causa de morte prematura, estima-se que 13% da população mundial hoje em dia se encontra obesa, segundo dados da Organização Mundial da Saúde.

### **1.3 O Guaraná e seu Uso Popular**

Podemos considerar a utilização de compostos vegetais uma das primeiras formas de medicina. A utilização de plantas é observada desde o início da nossa organização como sociedade (Martel *et al.*, 2016). O guaraná,

## PARTE I

em especial, tem sido utilizado por populações indígenas antes da colonização, índios da tribo Maués já utilizavam uma bebida a base de Guaraná em caçadas de longa duração (Smith e Atroch, 2010), provavelmente por seus efeitos estimulantes. Os efeitos estimulantes do Guaraná já são estudados na literatura, devido à grande quantidade de cafeína presente na semente (Bittencourt Lda *et al.*, 2014). O potencial do Guaraná frente ao problema da obesidade vem a um possível efeito termogênico, devido à cafeína presente no extrato. Além disso, outros problemas da obesidade são a inflamação crônica observada em indivíduos obesos (Park *et al.*, 2010) e um aumento no estresse oxidativo (Lechuga-Sancho *et al.*, 2018). Estudos mostram que o consumo de guaraná está relacionado à uma menor incidência de obesidade e síndromes metabólicas, assim como marcadores de estresse oxidativo em populações amazônicas (Krewer Cda *et al.*, 2011). Além disso o Guaraná também possui efeitos regulatórios em genes adipogênicos e antiadipogênicos (Lima *et al.*, 2017).

Recentemente têm sido preconizado o uso de compostos a base de ervas medicinais no combate à obesidade (Saad *et al.*, 2017). Muitas das vezes a justificativa para o efeito no combate à obesidade é via alterações na microbiota, porém é necessário estudar cada caso separadamente, visto que observamos um efeito tóxico advindo do consumo de compostos que são utilizados na medicina popular (Posadzki *et al.*, 2005). Por isso é de extrema importância analisar os efeitos de compostos utilizados na medicina popular através da metodologia científica.

## PARTE I

### **Justificativa**

Tendo em vista que a obesidade está relacionada a alterações na microbiota e que o extrato de sementes de guaraná é bastante consumido pela populações devido a suas propriedades anti-obesogênicas e que pouco se sabe sobre os efeitos do guaraná sobre a microbiota de indivíduos obesos, este trabalho teve como objetivo geral determinar os efeitos do guaraná sobre a microbiota de ratos Wistar submetidos a uma dieta obesogênica.

## PARTE I

### **2. Objetivos**

Caracterizar as alterações na microbiota intestinal de ratos Wistar obesos e não-obesos através da administração do extrato comercial de guaraná (*Paullinia cupana*).

#### **2.1 Objetivos específicos**

- 1- Induzir e caracterizar a obesidade em ratos Wistar de 90 dias de vida submetidos à uma dieta padrão que mimetiza a dieta ocidental.
- 2- Caracterizar os parâmetros oxidativos nos órgãos fígado, rins e intestino delgado devido à administração do extrato de guaraná e do consumo da dieta obesogênica padronizada.
- 3- Caracterizar a microbiota de ratos Wistar que receberam a dieta obesogênica padronizada.
- 4- Avaliar se o tratamento com extrato de semente guaraná foi capaz de modular os parâmetros oxidativos e inflamatórios.
- 5- Avaliar se o tratamento com o extrato de semente de guaraná foi capaz de reverter ou amenizar a disbiose causada pela obesidade.

## PARTE II

### 3 Material e Métodos

#### 3.1 Os animais

Foram utilizados 54 ratos machos Wistar com 90 dias de idade obtidos no biotério do Departamento de Bioquímica - UFRGS mediante aprovação do do projeto no CEUA sob o número 23900. Os ratos foram mantidos em salas específicas do biotério, seguindo todas os padrões do (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010*), pelas normas de bem-estar em animais de laboratório e biosegurança em experimentação animal, de acordo com a Sociedade Brasileira de Experimentação e Ciência em Animais de Laboratório. Também foram respeitadas as leis de uso e manipulação de animais em pesquisa: A Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 e a resolução de nº 879, de 15 de fevereiro de 2008.

#### 3.2 Dieta e Tratamento

Os animais foram mantidos em gaiolas com água e divididos em 6 grupos, correspondendo à 3 tratamentos e 2 dietas distintas. Os grupos: Controle dieta Chow e dieta obesogênica (Solução Salina), Cafeína (60mg/Kg) dieta Chow e dieta obesogênica, *Paullinia cupana* (0,021g/Kg) dieta Chow e dieta obesogênica, as gavagens foram administradas aos animais todos os dias aproximadamente às 17h. Os animais da dieta Chow receberam a ração comercial própria do biotério. A dieta obesogênica foi preparada no laboratório 32, utilizando-se um modelo que mimetiza a dieta ocidental, composta por uma maior quantidade de gordura, sal e açúcar e pobre em fibras (Bortolin 2018). Todos os animais tiveram acesso à dieta correspondente *ad libitum*. A dieta obesogênica foi trocada a cada 72h e os restos deixados na caixa foram pesados para o controle do consumo alimentar. Decidimos começar o tratamento com guaraná 30 dias após o início da dieta obesogênica nos grupos obesos para observar se o extrato seria capaz de modular a microbiota intestinal que já sofreu um desbalanço devido à alimentação.

#### 3.3 Dieta Obesogênica Padrão:



## PARTE II

Proteína de soja - 200g  
Banha de porco - 180g  
Amido de Milho - 170g  
Açúcar Refinado - 300g  
Fibras - 25g  
Sal refinado - 14,5g  
Mix Vitamínico - 10g  
Mix de Minerais - 40g  
Mix de Aminoácidos - 8g  
Óleo de Soja - 40g  
Água - 200mL

**Tabela 1:** Grupos e Tratamentos

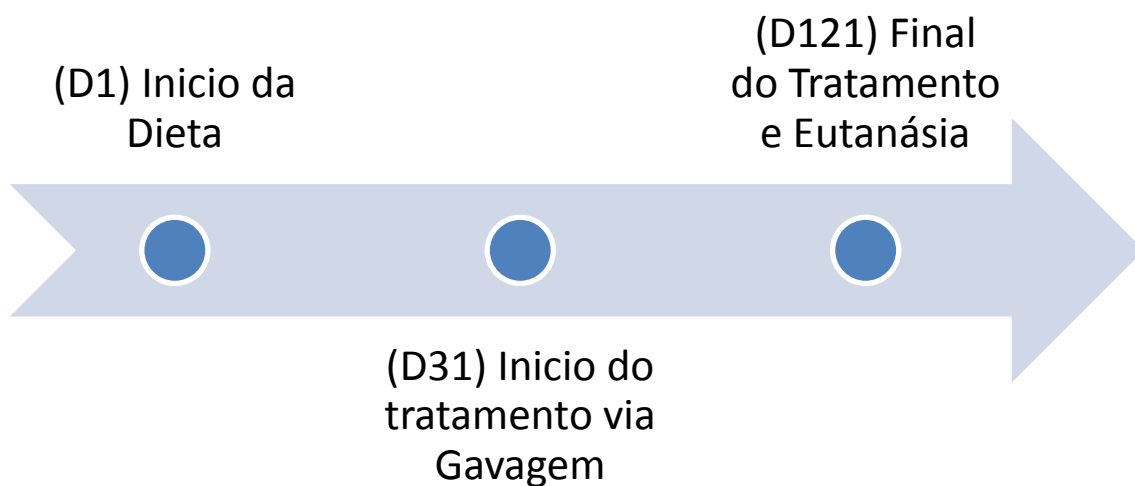
<b>Grupo</b>	<b>Nº</b>	<b>Tratamento</b>
<b>Controle Chow</b>	6	Salina 0.9% via gavagem + Dieta Chow
<b>Cafeína Chow</b>	6	Cafeína (60 mg/kg) via gavagem + Dieta Chow
<b>Guaraná Chow</b>	6	Extrato de Guaraná (0,021g/kg) via gavagem + Dieta Chow
<b>Controle Obeso</b>	12	Salina 0.9% via gavagem + Dieta de Obesogênica
<b>Cafeína Obeso</b>	12	Cafeína (60 mg/kg) via gavagem + Dieta de Obesogênica
<b>Guaraná Obeso</b>	12	Extrato de Guaraná (0,021g/kg) via gavagem + Dieta de Obesogênica

### 3.4 Extrato de Sementes do Guaraná e Dose utilizada

Utilizamos o extrato comercial feito a partir de sementes secas do Guaraná da marca Lifar™. Esse extrato é vendido popularmente em farmácias e consumido pela população em geral. A dose do extrato de Guaraná utilizada nesse estudo corresponde ao consumo indicado pelo fabricante, sendo 1g de extrato diluído em

## PARTE II

água e consumido uma vez ao dia. Essa dose representa a utilização popular do extrato na medicina não-tradicional, sendo feito o cálculo de 1g por dia para um adulto de 70kg temos a quantidade de 0,021g/kg. A dose de cafeína corresponde à mesma quantidade presente na dose do extrato de Guaraná, agindo como um segundo controle. Os animais receberam suplementação com extrato diariamente, via gavagem em volume máximo de 700uL, calculado de acordo com o peso individual de cada animal que foi acompanhado semanalmente para a administração adequada de cada tratamento.



**Fig. 1:** Linha do tempo experimental.

### 3.5 Análises do Perfil Oxidativo

Foram investigados diversos parâmetros enzimáticos no fígado, rim e intestino delgado, estruturas previamente isoladas cirurgicamente, armazenadas a -80°C e homogeneizadas em tampão fosfato (PBS 50mM).

A atividade da enzima catalase (CAT) foi avaliada de acordo com Aebi, (1984). Brevemente, as amostras diluídas e ponderadas foram incubadas com peróxido de hidrogênio 1M e Tampão Fosfato 10mM, medimos a atividade pela

## PARTE II

observação da taxa de degradação do peróxido de hidrogênio através da leitura da absorbância em espectrofotômetro a 240 nm. A atividade enzimática foi inferida pela fórmula, sendo 1 U de CAT a quantidade de enzima necessária para decompor 1 µMol de peróxido por minuto à 25 °C no pH 7:

$$\text{U CAT/mg proteína} = \frac{(\Delta\text{Abs}_{1\text{min}}) \times 0,2 \times 1000}{43,6 \times 0,67 \times \text{prot (mg)}}$$

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi avaliada de acordo com Misra e Fridovich (1972). Brevemente, foi feito uma curva de concentração com quatro pontos para cada amostra, as amostras foram incubadas com Tampão Glicina (50mM), enzima Catalase purificada (10µM), e Adrenalina (60mM). Medimos a atividade de todas as isoformas da enzima SOD (SOD1 + SOD2 + SOD3) pela quantificação da inibição da auto-oxidação do superóxido dependente da adrenalina em espectrofotômetro a 480 nm. O cálculo é feito baseado na estimativa que 1U de SOD é a quantidade de enzima capaz de decrescer em 50 % a formação de superóxido no sistema. A adição de Catalase evita possíveis erros devido à formação de peróxido resultante da detoxificação do radical superóxido pela enzima SOD.

A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) foi avaliada de acordo com Wendel (1981). Brevemente, as amostras foram incubadas com PBS, Glutathiona reduzida (40µM), Glutathiona redutase (40U/mL), NADPH (5mM) e Tert-ButilHidroperóxido (7.8 mM). A atividade foi avaliada através da inibição na taxa de oxidação do NADPH pelo peróxido em espectrofotômetro a 340 nm, expressa pela fórmula:

$$\text{umol NADPH/min/mg proteína} = \frac{(\Delta\text{Abs}_{1\text{min}}) \times 0,2 \times 1000}{6,22 \times 0,67 \times \text{prot (mg)}}$$

Atividade da enzima glutathiona-S-transferase (GST) foi avaliada de acordo com Habig e Jakoby (1981). Brevemente, as amostras foram incubadas PBS (100mM), Glutathiona reduzida (20mM) e 1-cloro-2 ,4-dinitrobenzeno 20mM (CDNB). A atividade é medida pela formação do conjugado GSH-CDNB catalisada pela GST, que produz um tioéterdinitrofenilo, o qual pode ser

## PARTE II

detectado por espectrofotometria no comprimento de onda de 340 nm, calculada pela fórmula:

$$\text{U GST/mg proteína: } \frac{\Delta 1 \text{ min} * 0,2 * 1000}{9,6 * 0,67 * \text{mg prot}}$$

### 3.6 Citocinas inflamatórias

A análise das citocinas inflamatórias foi pela técnica de ELISA indireto (Gasparotto *et al.*, 2013), sendo realizada no soro sanguíneo. Foram utilizados anticorpos contra as proteínas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

### 3.7 Coleta Cecal

O conteúdo foi coletado e armazenado após a eutanásia em microtubos previamente esterilizados por 20 min no UV dentro do fluxo laminar. Todos os passos de manipulação de amostra foram feitos com o máximo de cuidado possível para evitar contaminação cruzada.

### 3.8 Extração do DNA

As extrações foram feitas utilizando o *QIAmp DNA Stool Mini Kit* da marca QIAGEN, específico para extração de DNA fecal. As amostras de material genético extraído foram armazenadas à -20 °C para amplificação e posterior purificação.

### 3.9 Amplificação do DNA

Os *primers* utilizados para amplificação por PCR foram os oligos F515 e R806.

### 3.10 Sequenciamento de alto desempenho dos produtos de amplificação dos genes de interesse

Para análise metagenômica das comunidades presentes nas amostras fecais, os fragmentos dos genes 16S gerados por PCR foram submetidos ao

## PARTE II

sequenciamento de alto desempenho utilizando-se um sequenciador *IonPersonalGenomeMachine (PGM) System* (Life Technologies).

A construção das bibliotecas foi realizada com o kit *Ion Plus Fragment Library* para amplicons curtos ( $\leq 350$ pb), a partir de uma quantidade inicial de 100 ng de produto de amplificação. A cada amostra foi incorporado um adaptador (*barcode*) do kit *IonXpressBarcode 1-16*. Todos os procedimentos para a construção das bibliotecas foram realizados como recomendado pelo fabricante. As bibliotecas foram quantificadas e equalizadas com o kit *Ion Library Equalizer*, conforme recomendado no manual do fabricante. A PCR em emulsão e os passos de enriquecimento foram realizados conforme descrição do kit *Ion PGM Template OT2 200*, utilizando o equipamento *IonOneTouch 2 System*. O sequenciamento foi realizado em um chip *Ion 316*, com o kit *Ion PGM Sequencing 200 v2*, seguindo as recomendações do fabricante.

### 3.11 Análise de sequenciamento de alto desempenho

Foi utilizada para análise da microbiota a pipeline desenvolvida no Brazilian Microbiome Project (*Pylro et al., 2016*).

A leitura do 16S rRNA foi gerada utilizando sequenciamento de alto rendimento e submetidas a um controle de qualidade. As sequências com comprimento mínimo de 100 pb foram triadas para remover bases de baixa qualidade. Os restos mortais foram sequências replicadas lidas e classificadas por ordem decrescente e depois filtradas para excluir singletons usando USEARCH v7.0.1090 (Edgar, 2013).

A atribuição taxonômica foi obtida através do software QIIME v1.7 (Edgar, 2013). OTUs foram selecionados com base em 97% de semelhança de sequências. Dados taxonômicos foram alcançados através do algoritmo de classificação usando o 97% de GreenGenes OTUs Versão 13.8 (Desantis *et al.*, 2006)

As análises de clusterização, e contribuição de cada gênero foram feitas através do software R Studio Versão 1.0.153. Na análise de clusterização fizemos a correlação da variação amostral através da análise de Bootstrap,

## PARTE II

utilizando-se o valor de 10.000, valor acima do platô observado na curva de rarefação, garantindo uma maior confiança na representação do ecossistema intestinal.

### **3.12 Descarte de resíduos**

O lixo resultante da limpeza da sala de eutanásia, papéis sujos com sangue e demais matérias foram acondicionados em sacos plásticos brancos identificados como risco biológico. As carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos plásticos brancos, identificados como risco biológico e foram congeladas a -20°C até o recolhimento, que foi realizado pela empresa licitada pela UFRGS. As luvas, ponteiros e tubos plásticos de amostra (ependorfs) que tiveram contato com quaisquer materiais de origem biológica foram desprezados em uma sacola de plástico branca (específica para contaminantes [risco biológico]), para descarte pela empresa licitada pela UFRGS que foi responsável por transporte e tratamento dos listados acima.

Os resíduos perfurantes/cortantes foram descartados em recipientes próprios (coletor de material, perfurantes/cortantes, carton Box). O recipiente, foi lacrado em sua própria caixa a qual foi devidamente identificada (PERIGO infectante) e encaminhada a secretaria para descarte apropriado.

O descarte dos reagentes químicos foi realizado no Departamento de Bioquímica de acordo com a tabela oferecida pelo Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos (CGTRQ) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os reagentes químicos foram separados em solvente orgânico halogenado e benzeno, solvente orgânico não halogenado, solvente orgânico passível de purificação, aquoso, resíduo sólido, reagente não desejável e matéria-prima para reciclagem. Estes resíduos foram descartados dentro de bombonas plásticas (para resíduos líquidos), caixas de papelão ou sacos plásticos (para sólidos), os quais foram rotulados (rótulo padrão do CGTRQ-[www.iq.ufrgs.br/cgtrq](http://www.iq.ufrgs.br/cgtrq)) e entregues na sala de resíduos.

### **3.13 Análise estatística**

## PARTE II

Os resultados dos testes de atividade enzimática, ganho de peso e peso das gorduras foram avaliados utilizando a análise de variância (ANOVA). Utilizamos também o teste Tukey para médias de diferenças com o auxílio dos professores e estudantes do Núcleo de Apoio de Estatística (NAE). Os resultados do sequenciamento foram avaliados utilizando o teste t Welch de dois lados na comparação entre dois grupos, devido à diferença na variância entre as amostras.

## **4. Resultados**

### **4.1 Ganho de peso**

O grupo Controle Chow apresentou um menor ganho de peso que o grupo Controle Ob. O grupo Cafeína Chow apresentou um menor ganho de peso que o grupo Cafeína Ob, porém o grupo Guaraná Chow não apresentou diferença estatística quando comparado com o grupo Guaraná Ob (Fig. 1A).

### **4.2 Peso das gorduras**

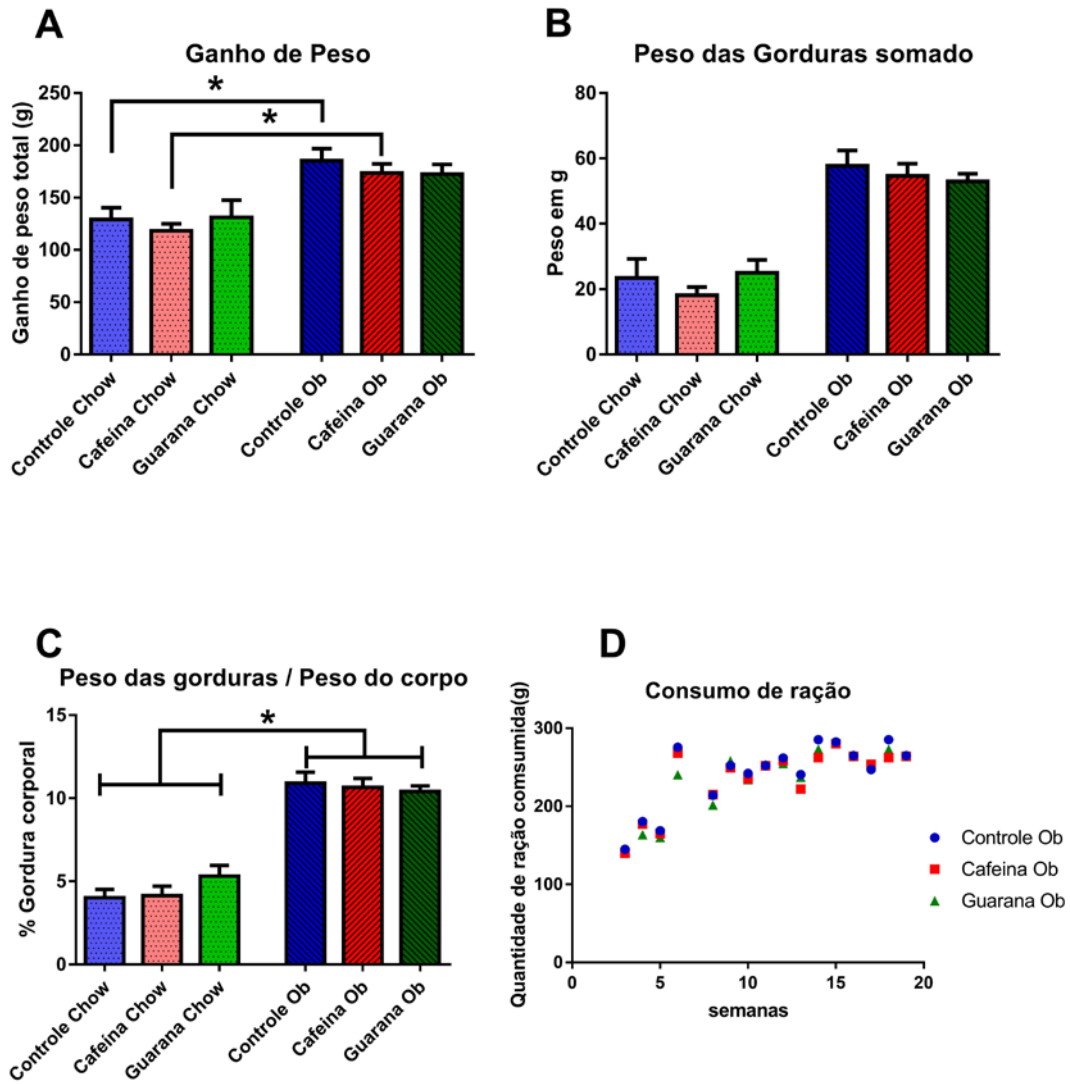
Foram retiradas e pesadas as gorduras visceral, gonadal e retroperitoneal. Observamos uma diferença entre o peso das gorduras dos animais que receberam a dieta obesogênica quando comparado aos que receberam a dieta padrão, mas não houve diferença entre os tratamentos. Utilizamos a porcentagem de gordura corporal em relação ao peso do corpo para ilustrar o acúmulo de tecido adiposo desses animais (Fig. 1B).

### **4.3 Consumo de ração**

O consumo de alimento foi medido nos animais que receberam a dieta obesogênica, porém não houve diferença no consumo entre os 3 tratamentos (Fig. 1D).



## PARTE II



**Fig. 2:** Ganho de peso e acúmulo de gordura. **A:** Ganho de peso final dos animais. **B:** Peso das gorduras somado, **C:** Porcentagem de gordura, **D:** Consumo de ração dos animais que receberam a dieta obesogênica

### 4.4 Atividade das Enzimas Antioxidantes

Medimos a atividade enzimática dos tecidos relacionados à digestão, com o objetivo de analisar se a dieta estaria influenciando a ação das enzimas protetoras, assim como avaliar como o tratamento com Guaraná modula o balanço redox nos órgãos do sistema digestivo.

## PARTE II

### 4.4.1 Fígado

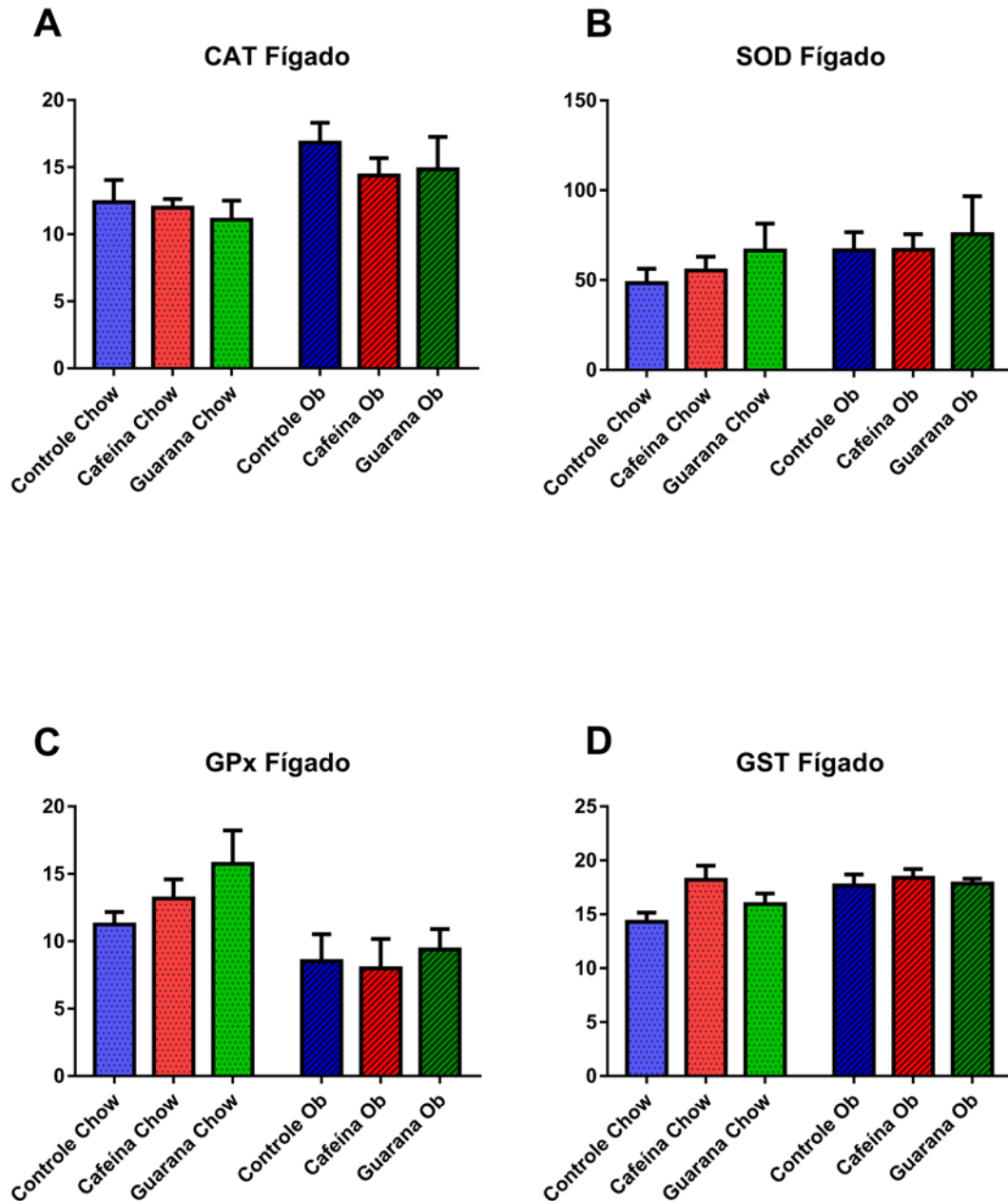
Não houve diferença estatística entre os grupos quanto à atividade da enzima CAT (Fig. 3A).

Não houve diferença estatística entre os grupos quanto à atividade da enzima SOD (Fig. 3B).

Não houve diferença estatística entre os grupos quanto à atividade da enzima GPx (Fig. 3C).

Não houve diferença estatística entre os grupos quanto à atividade da enzima GST (Fig. 3D).

## PARTE II



**Fig. 3** Atividade das enzimas antioxidantes no órgão Fígado. **A:** Atividade da enzima Catalase; **B:** Atividade da enzima Superóxido dismutase; **C:** Atividade da enzima Glutathione Peroxidase. **D:** Atividade da enzima Glutathione-S-transferase. Asterisco:  $p < 0.05$ .

### 4.4.2 Intestino Delgado

## PARTE II

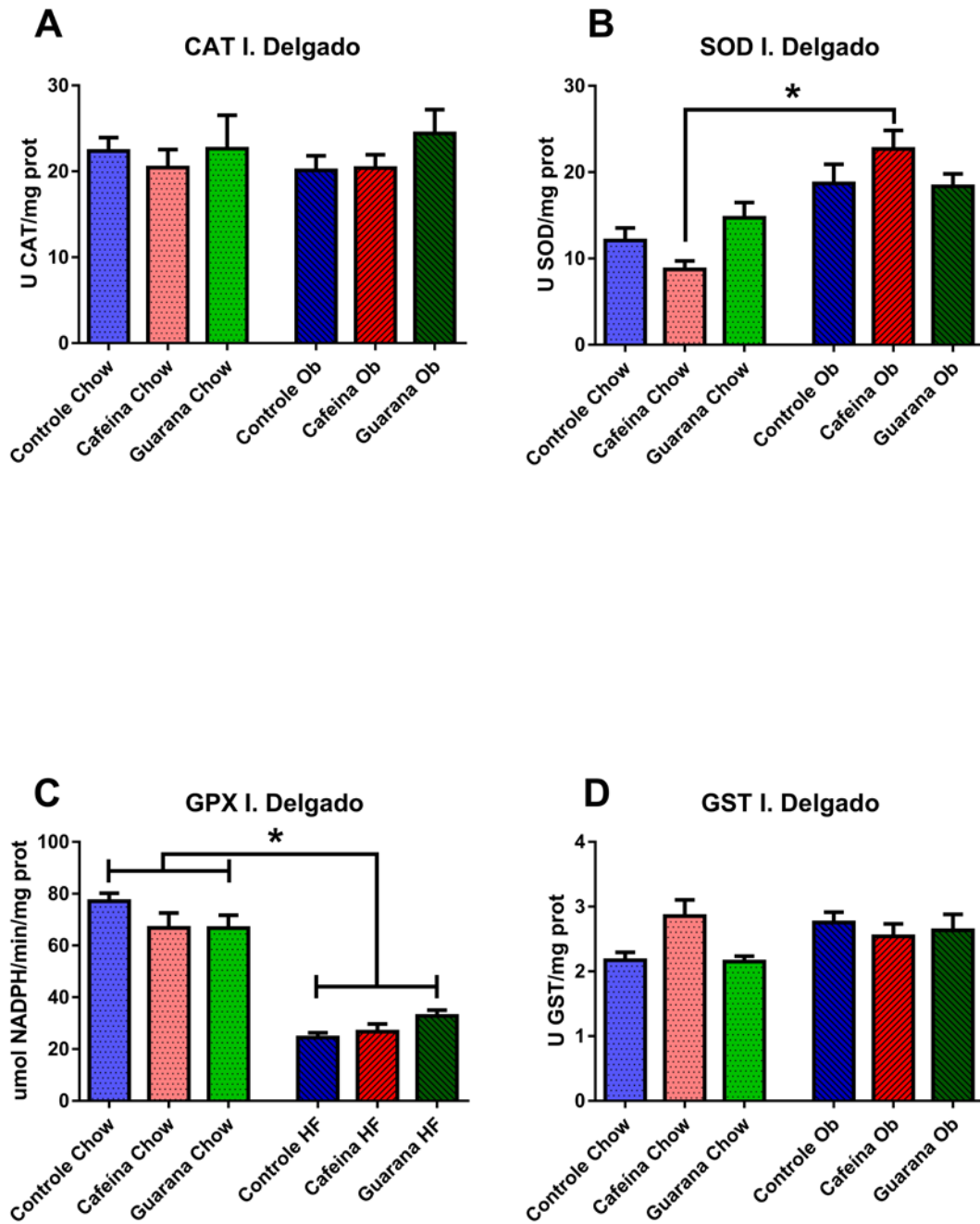
Não houve diferença estatística entre os grupos quanto à atividade da enzima CAT (Fig. 4A).

Analisando a atividade da enzima SOD, observamos que não há diferença entre os grupos Chow e não há diferença entre os grupos Ob, porém o grupo Cafeína Chow é menor que os 3 grupos Ob e o grupo Cafeína Ob é maior que os 3 grupos Chow (Fig. 4B).

Analisando a enzima GPx, observamos que os 3 grupos Chow e os 3 grupos Ob não apresentaram diferença estatística entre si, porém todos os grupos Chow são diferentes de todos os grupos Ob, mostrando um efeito da dieta e não do tratamento (Fig. 4C).

Não houve diferença estatística entre os grupos quanto à atividade da enzima GST (Fig. 4D).

PARTE II



**Fig. 4:** Atividade das enzimas antioxidantes na porção do Intestino Delgado. **A:** Atividade da enzima Catalase; **B:** Atividade da enzima Superóxido dismutase; **C:** Atividade da enzima Glutathiona Peroxidase. **D:** Atividade da enzima Glutathiona-S-transferase. Asterisco:  $p < 0.05$ .

## PARTE II

### 4.4.3 Rim

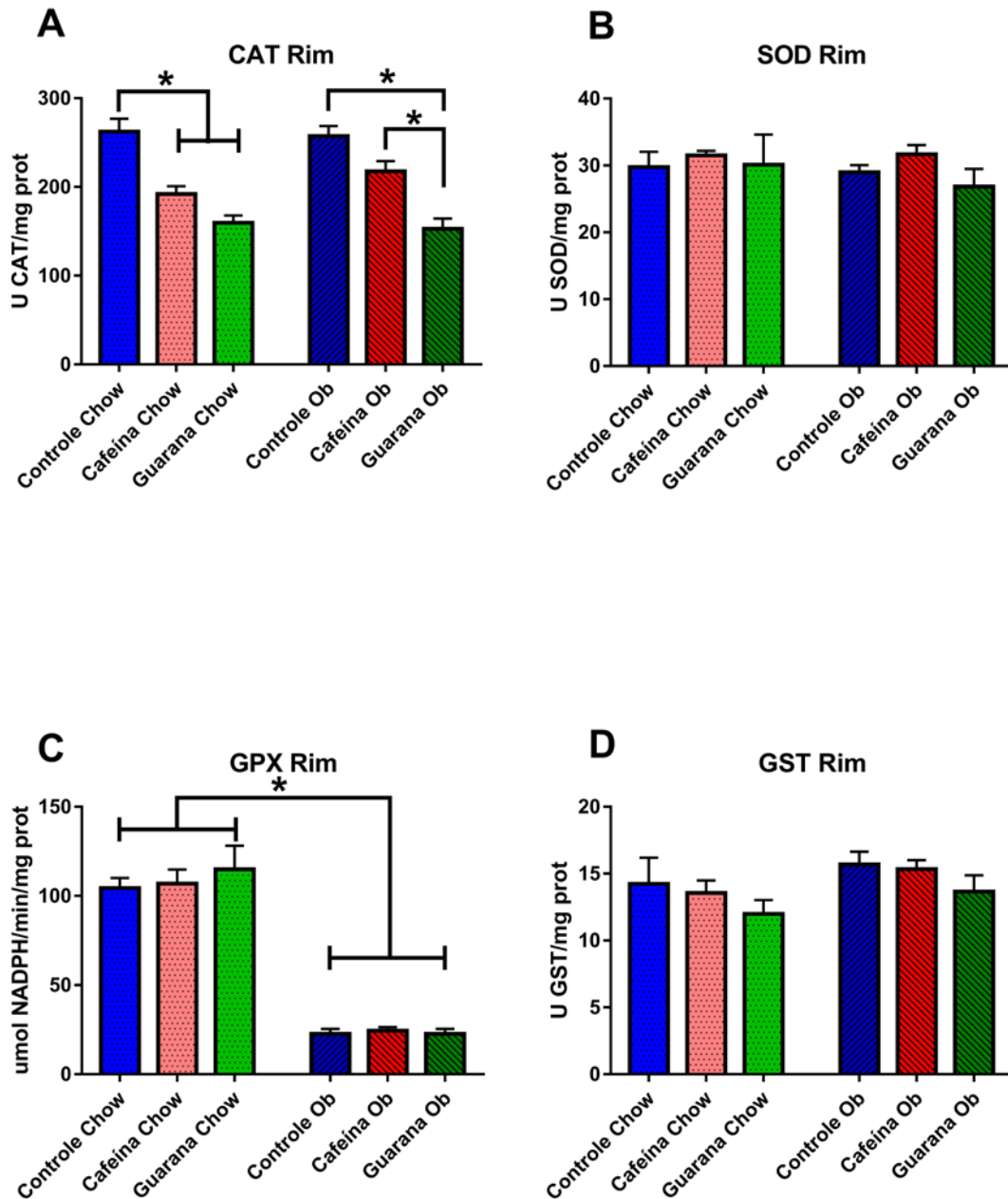
Analisando a atividade da enzima CAT, o grupo Cafeína Chow e Guaraná Chow apresentaram uma atividade menor que o grupo Controle Chow. Não houve diferença entre o grupo Controle Ob e o grupo Cafeína Ob. O grupo Guaraná Ob apresentou uma atividade menor que os grupos Controle Ob e Cafeína Ob (Fig. 5A).

Não houve diferença estatística entre os grupos quanto à atividade da enzima SOD (Fig. 5B).

Analisando a enzima GPx, observamos que os 3 grupos Chow e os 3 grupos Ob não apresentaram diferença estatística entre si, porém todos os grupos Chow são diferentes de todos os grupos Ob, mostrando um efeito da dieta e não do tratamento (Fig. 5C).

Não houve diferença estatística entre os grupos quanto à atividade da enzima GST (Fig. 5D).

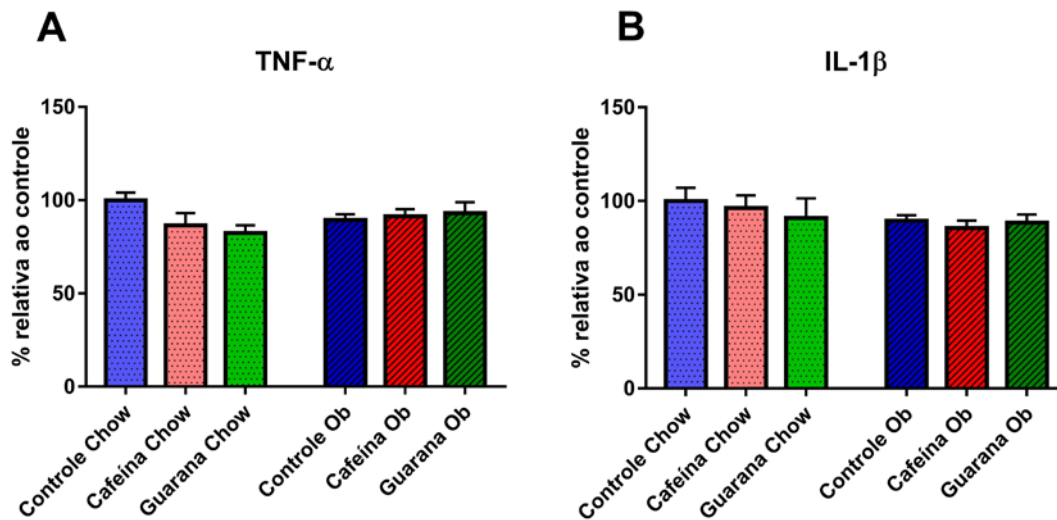
PARTE II



**Fig. 5:** Atividade das enzimas antioxidantes no órgão Rim. **A:** Atividade da enzima Catalase; **B:** Atividade da enzima Superóxido dismutase; **C:** Atividade da enzima Glutaciona Peroxidase. **D:** Atividade da enzima Glutaciona-S-transferase. Asterisco:  $p < 0.05$ .

#### 4.5 Citocinas Proinflamatórias

Medimos a quantidade de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no soro dos animais. Não houve diferença estatística entre os grupos quanto às duas citocinas analisadas (Fig 6).



**Fig. 6:** Quantificação das Citocinas Inflamatórias. **A:** TNF- $\alpha$ , **B:** IL-1 $\beta$

#### 4.6 Microbiota Intestinal

##### 4.6.1 Número de leituras

Não houve diferença no número total de leituras entre os grupos (Fig 7A). A parte estatística dos dados advindos do sequenciamento foi feita com a abundância absoluta (número de leituras) para minimizar possíveis erros estatísticos, porém a parte gráfica está apresentada com a abundância relativa (% em relação ao total) para uma melhor visualização e comparação entre grupos.

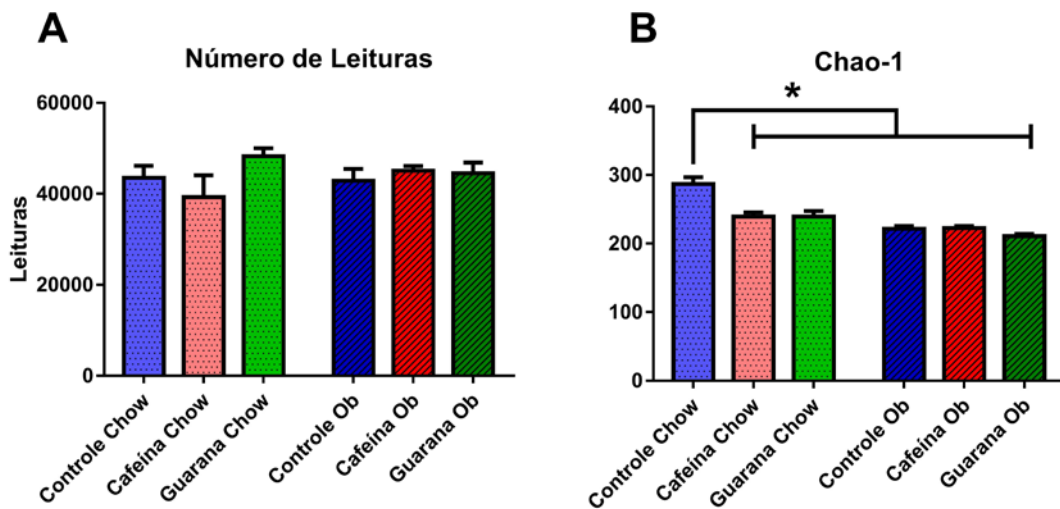
##### 4.6.2 Diversidade Bacteriana

Analisamos a diversidade ecológica dos grupos através do software QIIME, escolhemos o índice Chao-1, um dos índices mais utilizados parâmetros para a diversidade  $\alpha$  de comunidades. Observamos uma



## PARTE II

diminuição nos 3 grupos que receberam a dieta obesogênica quando comparados com o grupo Controle Chow (Fig. 7B).

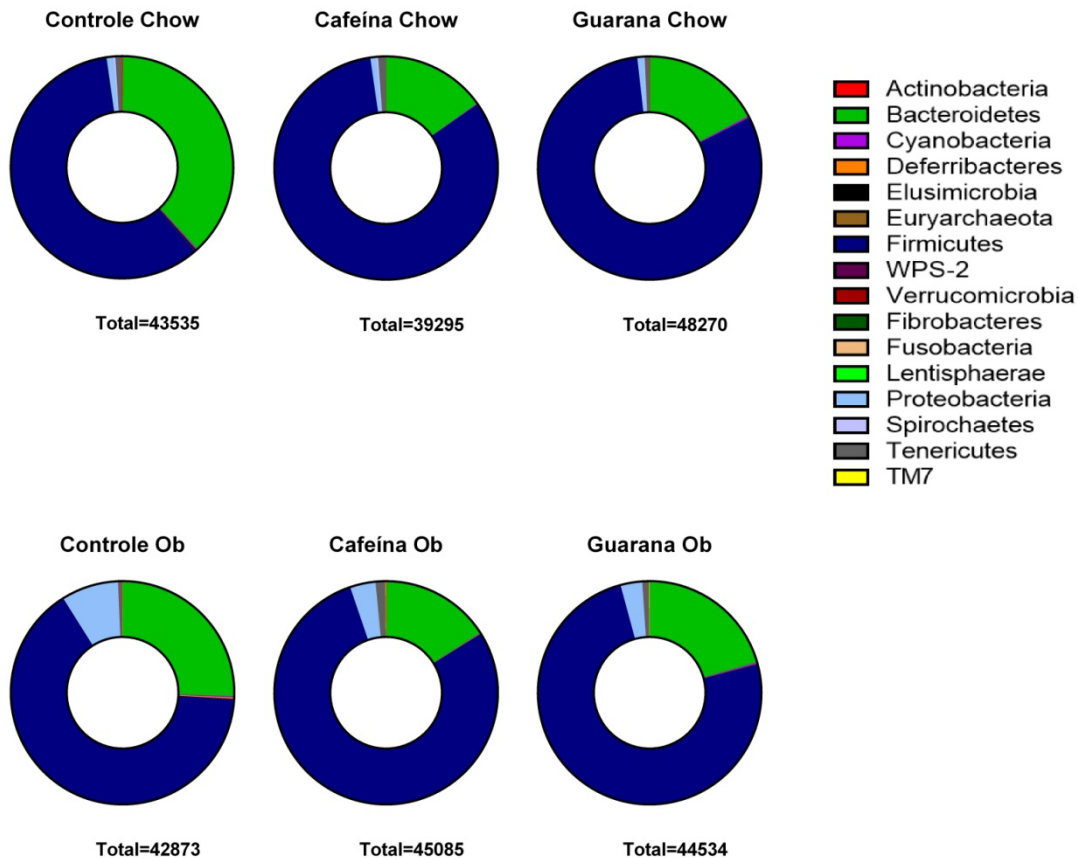


**Fig. 7:** Quantidade bacteriana e Diversidade  $\alpha$ . **A:** Número total de leituras do fragmento 16S após purificação, **B:** Índice de  $\alpha$ -diversidade Chao-1 nas amostras. Asterisco:  $p < 0.05$ .

### 4.6.3 Filos bacterianos

Analisamos a abundância absoluta dos filos bacterianos das amostras, sendo possível analisar a disbiose de uma maneira geral observando-se as alterações nos filos (Fig. 8). Além da proporção geral de todos os filos, detalharemos aqui os filos mais relevantes observados nesse estudo.

## PARTE II



**Fig. 8:** Proporção de filos bacterianos em cada tratamento.

### 4.6.3.1 *Bacteroidetes*

Não houve diferença estatística entre os 3 grupos que receberam a dieta Chow. Quando analisamos os animais que receberam a dieta obesogênica observamos que o grupo Controle Ob apresenta uma abundância maior de bactérias do filo *Bacteroidetes* que o grupo Cafeína Ob, sem diferença estatística com o grupo Guaraná Ob. Não há diferença estatística entre o grupo Cafeína Ob e Guaraná Ob quanto ao filo *Bacteroidetes*. Não há diferença estatística entre os grupos de mesmo tratamento com dietas diferentes Controle Chow e Controle Ob; Cafeína Chow e Cafeína Ob; Guaraná Chow e Guaraná Ob. (Fig. 9A)

### 4.6.3.2 *Firmicutes*

Não houve diferença estatística entre os 3 grupos que receberam a dieta Chow. Quando analisamos os animais que receberam a dieta obesogênica

## PARTE II

observamos que o grupo Controle Ob apresenta uma abundância menor que os grupos Cafeína Ob e Guaraná Ob. Não há diferença estatística entre os grupos de mesmo tratamento com dietas diferentes Controle Chow e Controle Ob; Cafeína Chow e Cafeína Ob; Guaraná Chow e Guaraná Ob (Fig 9B).

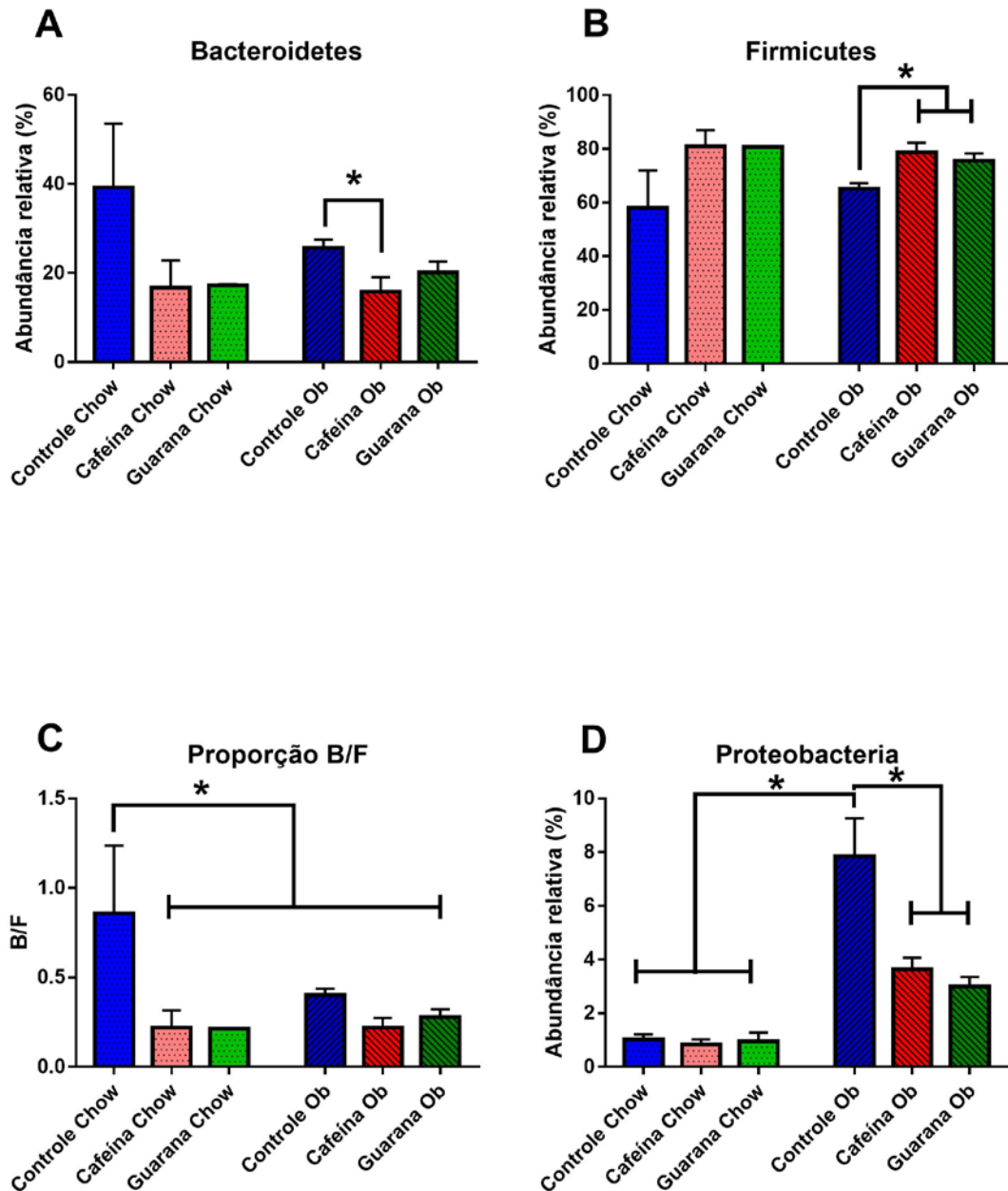
### **4.6.3.3 Proporção Bacteroidetes/Firmicutes**

A razão entre B/F é uma maneira útil de demonstrar alterações entre os dois principais filos bacterianos, visto que esses filos geralmente respondem de maneira oposta aos tratamentos e condições clínicas distintas. Podemos observar que a razão B/F do grupo Controle Chow é maior quando comparada com os outros grupos. Não há diferença estatística entre os grupos Cafeína Chow e Guaraná Chow. Não há diferença estatística entre os grupos que receberam a dieta obesogênica. Não há diferença entre os Cafeína Chow e Cafeína Ob e Guaraná Chow e Guaraná Ob (Fig 9C).

### **4.6.3.4 *Proteobacteria***

Não houve diferença entre os grupos que receberam a dieta Chow, os 3 grupos dessa dieta apresentaram uma abundância muito baixa de bactérias desse filo. O grupo Controle Ob apresentou o maior valor de abundância para o filo *Proteobactéria*, sendo maior que os todos os outros 5 grupos. O grupo Cafeína Ob apresentou uma maior abundância que o grupo Cafeína Chow e o grupo Guaraná Ob apresentou uma maior abundância que o grupo Guaraná Chow. Não houve diferença estatística entre os grupos Cafeína Ob e Guaraná Ob (Fig. 9D).

## PARTE II



**Fig. 9: Abundância absoluta dos Filos Bacterianos e Proporção F/B. A:** Bacteroidetes, **B:** Firmicutes, **C:** Proporção da abundância Bacteroidetes/Firmicutes, **D:** Proteobacteria, Asterisco:  $p < 0.05$ .

### 4.6.4 Famílias bacterianas

#### 4.6.4.1 *Bifidobacteriaceae*

O grupo Controle Chow apresentou uma maior abundância da família *Bifidobacteriaceae* comparado com os outros 5 grupos. Não houve diferença

## PARTE II

estatística entre os grupos Ob e entre os grupos Cafeína Chow e Guaraná Chow. Podemos observar que tanto os tratamentos com Cafeína e Guaraná, quanto a dieta obesogênica, quase extinguem essa família (Fig 10A).

### **4.6.4.2 *Enterobacteriaceae***

Não houve diferença estatística entre os grupos que receberam a dieta Chow. Observamos uma maior abundância dessa família nos grupos Controle Ob e Cafeína Ob quando comparados com os 3 grupos da dieta Chow e comparados com o grupo Guaraná Ob. Não houve diferença entre o grupo Guaraná Ob e os grupos Chow (Fig. 10B).

### **4.6.4.3 *Lactobacillaceae***

Observamos uma menor abundância nos 3 grupos que receberam a dieta obesogênica comparados com os grupos que receberam a dieta Chow. Não há diferença entre os grupos de que receberam a mesma dieta (Fig 10C).

### **4.6.4.4 *Rumnicocaceae***

Não há diferença estatística entre os 3 grupos que receberam a dieta Chow quanto à família *Rumnicocaceae*. Houve um aumento na abundância no grupo Controle Ob comparado com o grupo Controle Chow, um aumento no grupo Cafeína Ob comparado com o grupo Cafeína Chow e um aumento no grupo Guaraná Ob comparado com o grupo Guaraná Chow. Também observamos um aumento na abundância no grupo Guaraná Ob comparado com o grupo Controle Ob (Fig. 10D).

### **4.6.4.5 *Bacteroidaceae***

Observamos uma menor abundância da família *Bacteroidaceae* no grupo Controle Chow comparado com o grupo Controle Ob, uma menor abundância no grupo Guaraná Chow comparado com o grupo Guaraná Ob, sem diferença estatística entre os grupos Cafeína Chow e Cafeína Ob (Fig. 10E).

### **4.6.4.6 *Prevotellaceae***

PARTE II

Observamos menor abundância da família *Prevotellaceae* do grupo Controle Ob comparado com o grupo Controle Chow e uma menor abundância no grupo Guaraná Ob comparado com o grupo Guaraná Chow (Fig. 10F).

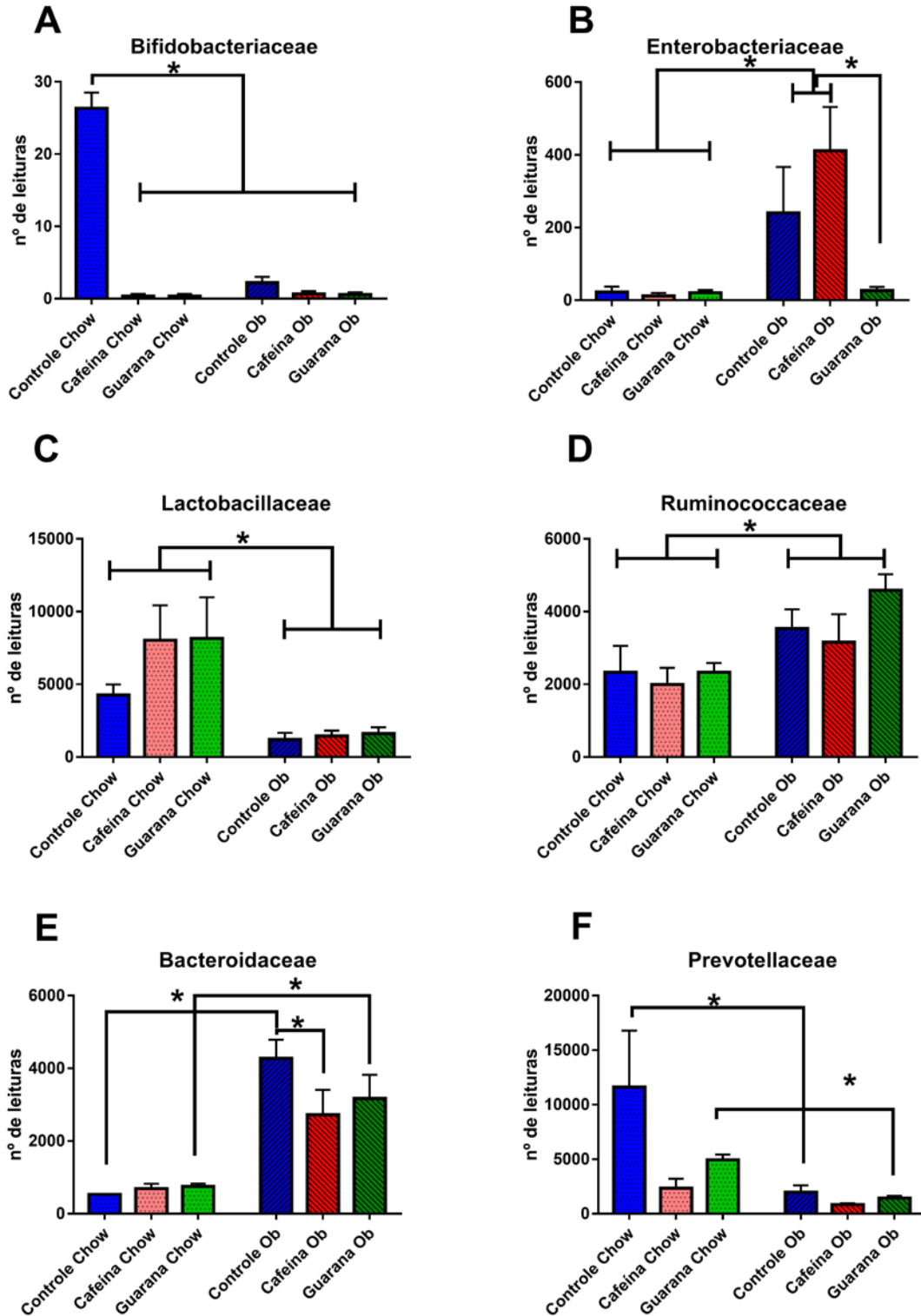


Fig. 10: Abundância absoluta das Famílias Bacterianas.

## PARTE II

**A:**Bifidobacteriaceae, **B:**Enterobacteriaceae, **C:** Lactobacillaceae, **D:** Ruminococacceae, **E:**Bacteroidaceae, **F:** Prevotellaceae. Asterisco:  $p < 0.05$ .

### 4.6.5 Gêneros bacterianos

#### 4.6.5.1 *Bifidobacterium*

Observamos uma maior abundância do gênero *Bifidobacterium* no grupo Controle Chow comparado com todos os outros grupos. Não há diferença estatística entre os outros grupos (Fig. 11A).

#### 4.6.5.2 *Lactobacillus*

Observamos uma maior abundância do gênero *Lactobacillus* no grupo Controle Chow comparado com o grupo Controle Ob, uma maior abundância no grupo Cafeína Chow comparado com o grupo Cafeína Ob e uma maior abundância no grupo Guaraná Chow comparado com o grupo Guaraná Ob. Não há diferença entre os grupos que receberam uma mesma dieta (Fig. 11B).

#### 4.6.5.3 *Mucispirillum*

Observamos uma abundância menor no grupo Controle Chow comparado com o grupo Controle Ob, uma menor abundância no grupo Cafeína Chow comparado com o o grupo Cafeína Ob, uma menor abundância no grupo Guaraná Chow comparado com o grupo Guaraná Ob. Também é possível observar uma abundância maior no grupo Controle Ob comparado com os grupos Cafeína Ob e Guaraná Ob (Fig. 11C).

#### 4.6.5.4 *Escherichia*

Observamos uma abundância maior no grupo Cafeína Ob comparado com os grupos Chow e com o grupo Guaraná Ob. Não houve diferença estatística entre os grupos Cafeína Ob e Controle Ob (Fig. 11D).

#### 4.6.5.5 *Bacteroides*

Observamos uma abundância menor no grupo Controle Chow comparado com o grupo Controle Ob, uma menor abundância no grupo Cafeína Chow comparado com o grupo Cafeína Ob, uma menor abundância no

## PARTE II

grupo Guaraná Chow comparado com o grupo Guaraná Ob. Também observamos uma maior abundância no grupo Controle Ob comparado com o grupo Cafeína Ob (Fig. 11E).

### **4.6.5.6 *Prevotella***

Observamos menor abundância do gênero *Prevotellaceae* do grupo Controle Ob comparado com o grupo Controle Chow e uma menor abundância no grupo Guaraná Ob comparado com o grupo Guaraná Chow (Fig. 11F).



PARTE II

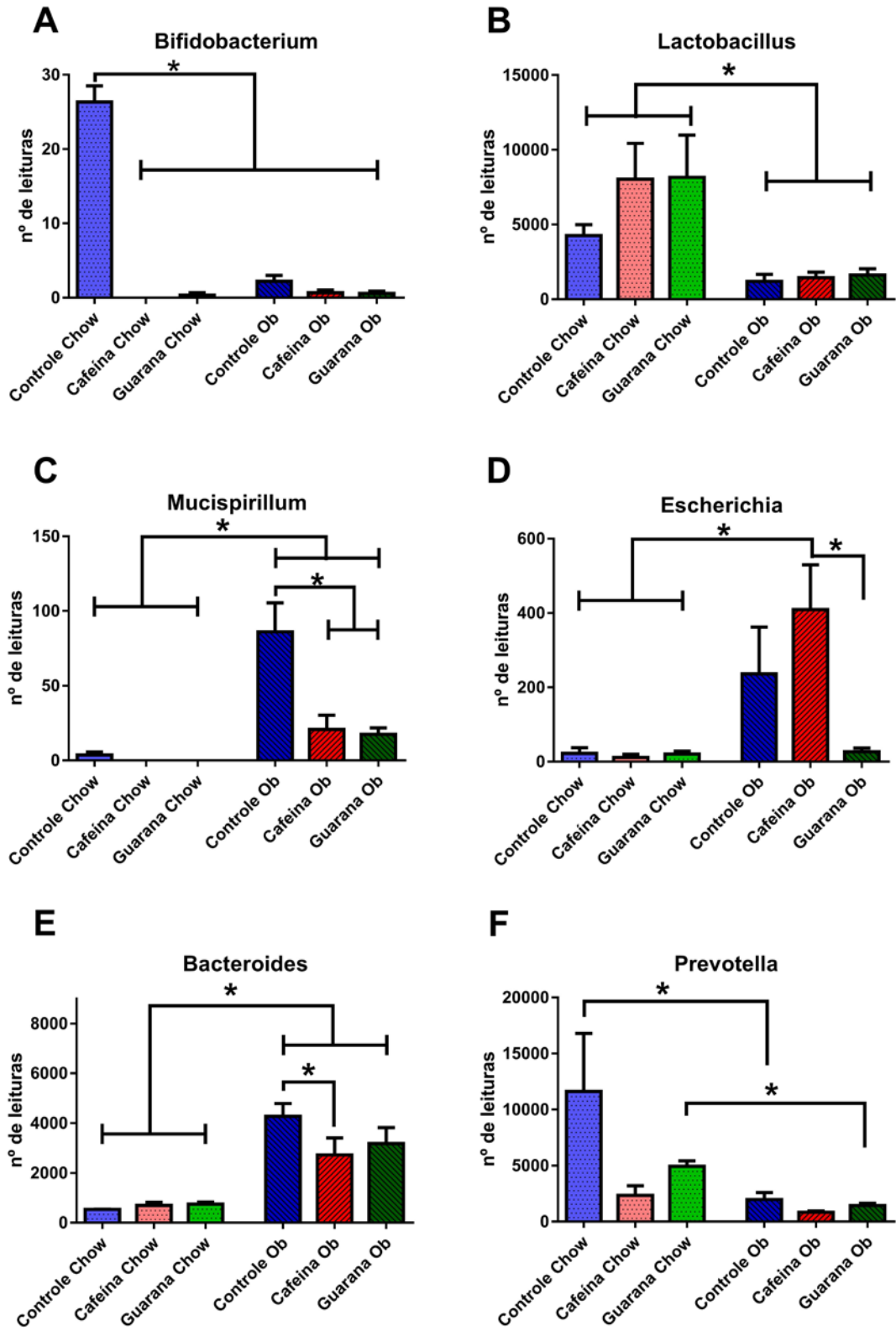


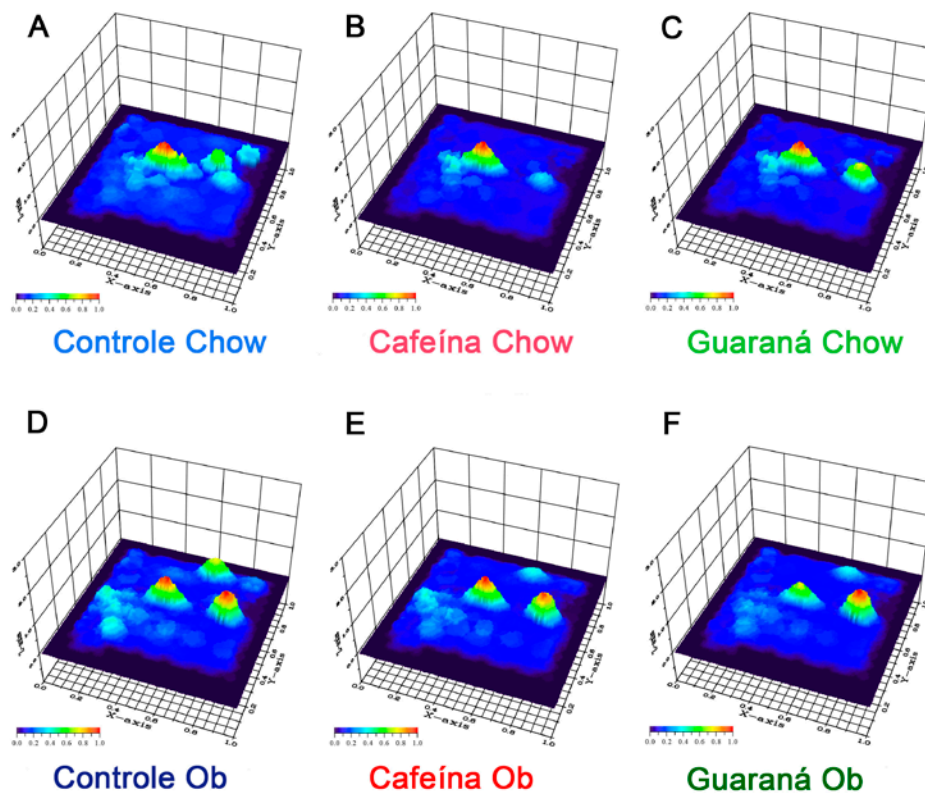
Fig. 11: Abundância Absoluta dos Gêneros Bacterianos. A:

## PARTE II

Bifidobacterium, **B**:Lactobacillus, **C**: Mucispirillum, **D**: Escherichia, **E**:Bacteroides, **F**: Prevotella. Asterisco:  $p < 0.05$ .

### 4.6.6 Análise de landscape pelo software ViaComplex

Podemos observar alterações na paisagem da microbiota entre os tratamentos, mas as alterações mais visíveis são devido à dieta (Fig. 12).

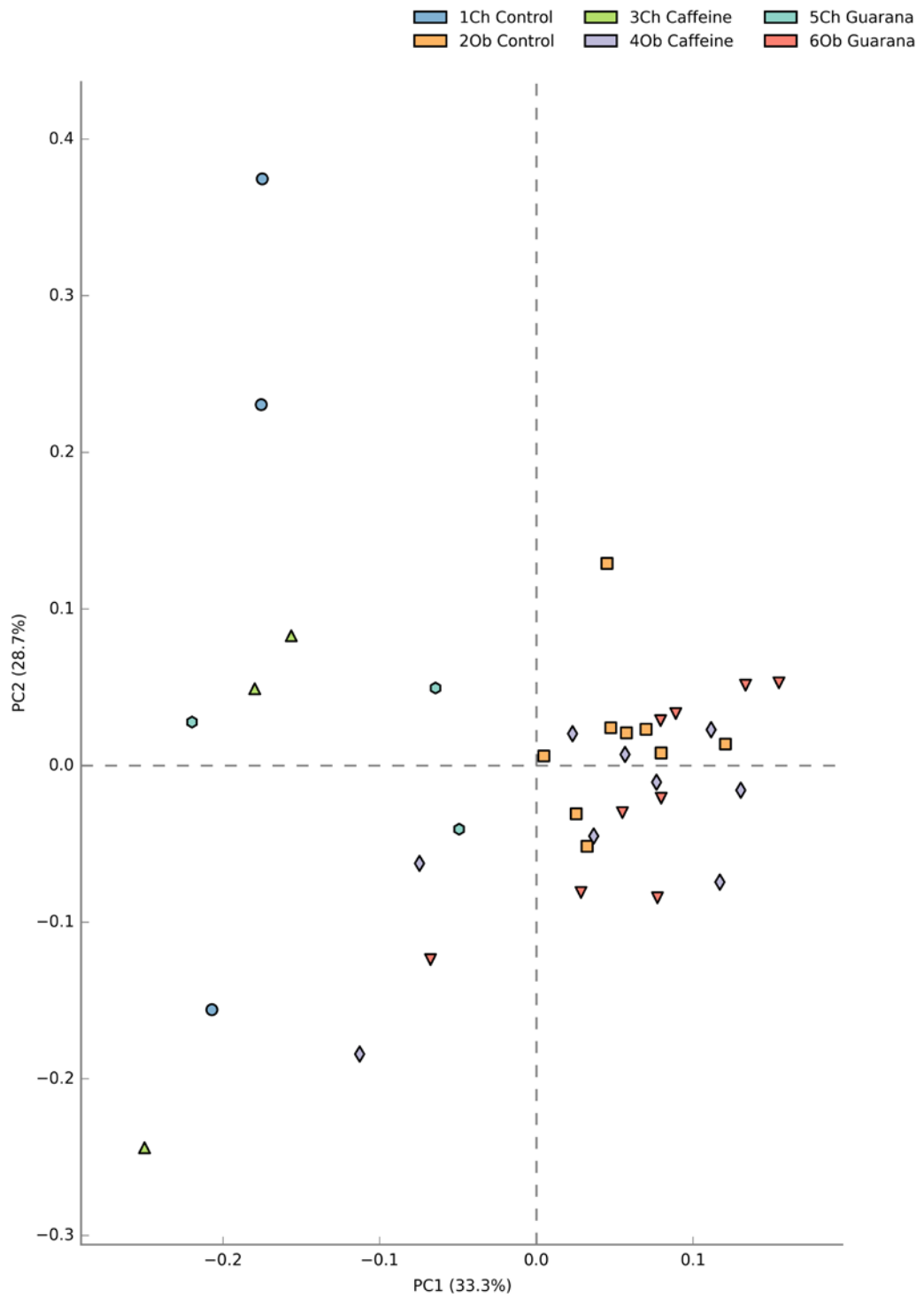


**Fig. 12:** Análise de Landscape da proporção de gêneros da microbiota intestinal. **A**:ControleChow, **B**:CafeínaChow, **C**: Guaraná Chow, **D**: Controle Obeso, **E**: Cafeína Obeso, **F**: Guaraná Obeso. Abundância de gênero expressa de 0 a 1.

### 4.6.7 Clusterização



## PARTE II



**Fig. 14 Análise de Componentes Principais.** Distribuição das amostras de acordo com a assinatura microbiana relativa aos gêneros.

## 5. Discussão

### 5.1 Utilização da Dieta Padronizada de Cafeteria

Mimetizar a típica dieta ocidental tem sido um desafio para pesquisadores que trabalham com o tema. Apesar da convergência dos hábitos alimentares devido à globalização, ainda temos diferenças nas dietas típicas dos países ocidentais. A dieta de obesogênica desenvolvida pelo nosso grupo minimiza muitos problemas de replicabilidade, enfrentados por estudos clássicos da chamada Western Diet (Bortolin *et al.*, 2017). Os maiores problemas na administração da típica dieta de cafeteria, composta por uma variedade de alimentos ultraprocessados, são a reprodução do modelo em países onde não são encontrados os mesmos produtos e a oportunidade dos animais escolherem quais desses produtos ofertados serão consumidos. Observamos em estudos do grupo que alguns animais preferem certos alimentos em detrimento de outros, o que gera uma diferença na alimentação dos animais do mesmo grupo experimental. Além das variações pela escolha do alimento, também há a grande concentração de conservantes alimentares nos produtos processados, gerando mais uma variável nas alterações da microbiota intestinal. Apesar dos conservantes estarem presentes na alimentação humana e na típica dieta ocidental, é difícil precisar se as alterações na microbiota intestinal são devido às diferenças nos nutrientes ou se são devido à inibição do crescimento bacteriano advinda dos conservantes (Bortolin, 2018).

### 5.2 Consumo Alimentar e Ganho de Peso

Todos os animais tiveram acesso à ração *ad libitum*. Devido aos efeitos termogênicos e estimulantes previamente descritos da cafeína e do próprio Guaraná (Smith e Atroch, 2010), esperávamos uma diminuição do acúmulo de gordura. Além disso também esta descrito queo guaraná possui efeitos regulatórios na adipogênese. Testes *in vitro* mostraram que um extrato de guaraná é capaz de aumentar a expressão de genes anti-adipogênicos e diminuir a expressão de genes adipogênicos, além de aumentar a translocação nuclear da B-catenina, o que contribui para a inibição da adipogênese (Lima *et al.*, 2017). Apesar da regulação do Guaraná por mais de uma via na

### PARTE III

metabolização e estoque de gorduras, não observamos nenhuma diferença entre o ganho de peso dos animais que receberam a mesma dieta. Comparando mesmos tratamentos em diferentes dietas observamos que os grupos Controle Ob e Cafeína Ob apresentarem um maior ganho de peso que os grupos Controle Chow e Cafeína Chow, respectivamente, sem diferenças entre o grupo Guaraná Ob e Guaraná Chow, porém essa diferença parece ser devido à um peso levemente maior dos animais do grupo Guaraná Chow.

Analisando o peso das gorduras somadas, assim como o percentual de gordura em relação ao peso do corpo, é possível perceber grandes diferenças entre os grupos que receberam a dieta Chow versus a dieta Obesogênica. Mesmo não observando diferença no ganho de peso dos animais que receberam Guaraná entre as duas dietas, a diferença é clara no acúmulo de tecido adiposo. Tanto o Guaraná quanto a cafeína não foram capazes de diminuir o acúmulo de gordura, independente da dieta. Também não há alteração no consumo de ração dos grupos Ob, o que nos mostra que não foi um aumento no consumo de alimento o responsável por essa falta de diferença entre os grupos. Os resultados nos levam a crer que a administração oral crônica do extrato de Guaraná, assim como o de cafeína, não tem efeito na adipogênese desses animais.

**Tabela 4:** Comparação entre Macronutrientes das dietas

Macronutrientes	Origem	Dieta	Dieta
		Obesogênica (1kg)	Chow (1kg)
<b>Proteínas</b>	Totais	200g	220g
<b>Lipídios</b>	Animal	180g	0g
	Vegetal	40g	4,5g
<b>Carboidratos</b>	Totais	470g	560g
	Fibras	25g	80g

## PARTE III

Apesar de quantidades semelhantes de carboidratos, na dieta obesogênica grande parte desses carboidratos são advindos do açúcar refinado, além de uma maior quantidade de gordura. Parte dos efeitos na microbiota devem ser devido á essa diferença na origem e na quantidade dos macronutrientes.

### **5.3 Regulação Redox e Inflamatória**

A regulação redox e inflamatória é importante para a manutenção do epitélio intestinal, assim como na homeostase dos órgãos do sistema digestivo. Visto que na obesidade observamos um quadro de endotoxemia, caracterizado pelo aporte crônico de LPS vindo da microbiota (Cani *et al.*, 2008), analisamos a atividade enzimática de dois importantes órgãos digestivos, fígado e rim, assim como a porção do intestino delgado mais próxima do ceco, o íleo. Também foi retirada a porção do intestino grosso imediatamente após o ceco desses animais, porém não foi possível medir a atividade enzimática desse tecido.

PARTE III

**Tabela 5. Efeito do Tratamento:** Comparação entre os dois tratamentos com seu respectivo controle a respeito da atividade enzimática nos 3 órgãos (seta vermelha para baixo indica diminuição, seta verde para cima indica aumento, símbolo de igualdade roxo significa sem diferenças estatísticas).

Enzima	Controle Ob	Cafeína Ob	Guaraná Ob
CAT	Fígado: =	Fígado: =	Fígado: =
	Int. D: =	Int. D: =	Int. D: =
	Rim: =	Rim: =	Rim: =
SOD	Fígado: =	Fígado: =	Fígado: =
	Int. D: =	Int. D: -	Int. D: =
	Rim: =	Rim: =	Rim: =
GPX	Fígado: =	Fígado: =	Fígado: =
	Int. D: -	Int. D: -	Int. D: -
	Rim: -	Rim: -	Rim: -
GST	Fígado: =	Fígado: =	Fígado: =
	Int. D: =	Int. D: =	Int. D: =
	Rim: =	Rim: =	Rim: =



### PARTE III

**Tabela 6. Efeito da dieta:** Comparação entre os grupos Chow versus o tratamento correspondente na dieta obesogênica respeito da atividade enzimática nos 3 órgãos (seta vermelha para baixo indica diminuição, seta verde para cima indica aumento, símbolo de igualdade roxo significa sem diferenças estatísticas).

Enzima	Cafeína	Guaraná	Cafeína Ob	Guaraná Ob
CAT	Fígado: =	Fígado: =	Fígado: =	Fígado: =
	Int. D: =	Int. D: =	Int. D: =	Int. D: =
	Rim: ↓	Rim: ↓	Rim: =	Rim: ↓
SOD	Fígado: =	Fígado: =	Fígado: =	Fígado: =
	Int. D: ↓	Int. D: =	Int. D: ↑	Int. D: =
	Rim: =	Rim: =	Rim: =	Rim: =
GPX	Fígado: =	Fígado: =	Fígado: =	Fígado: =
	Int. D: =	Int. D: =	Int. D: =	Int. D: =
	Rim: =	Rim: =	Rim: =	Rim: =
GST	Fígado: =	Fígado: =	Fígado: =	Fígado: =
	Int. D: =	Int. D: =	Int. D: =	Int. D: =
	Rim: =	Rim: =	Rim: =	Rim: =

Observamos que o fígado desses animais não foi afetado quanto à atividade das enzimas antioxidantes, tanto pelo tratamento quanto pela dieta. Imaginamos que apesar do ganho de peso e acúmulo de tecido adiposo, a dieta por si não foi capaz de induzir síndrome metabólica. Analisando a Tabela 5, onde comparamos os dois grupos tratados com seu controle relativo, podemos ver o efeito do tratamento com cafeína ou Guaraná. Podemos observar que a atividade da enzima CAT diminuiu com os dois tratamentos nos animais que receberam a dieta Chow no rim e apenas no grupo Guaraná nos animais que receberam a dieta obesogênica. Já a enzima SOD responde ao tratamento de cafeína no intestino delgado, diminuindo na dieta Chow e aumentando na dieta obesogênica. Na tabela 6 observamos o efeito da dieta, onde cada grupo foi Chow comparado com o tratamento correspondente na dieta obesogênica. Podemos observar que a atividade enzima GPx diminuiu em todos os tratamentos, tanto no rim quanto no intestino delgado devido à dieta. A diminuição da atividade enzima GPx foi bem expressiva em todos os grupos

## PARTE III

da dieta. Essa diminuição no intestino delgado e rim pode ser devido à maior concentração de sal e açúcar na dieta, causando uma sobrecarga renal e consequente desbalanço nas enzimas.

A enzima GST possui um papel importante na detoxificação de xenobióticos, ela diminui o estresse químico conjugando os xenobióticos com GSH (Gonul *et al.*, 2012), sendo um dos primeiros passos no processo de detoxificação. Em outros estudos do nosso grupo, observamos que a atividade da GST está aumentada no rim e intestino de animais que receberam um tratamento curto com Guaraná (Artigo em submissão). A administração do Guaraná e da cafeína de maneira crônica não causou um aumento na atividade dessa enzima.

O LPS induz um sinal inflamatório no hospedeiro, induzindo a liberação de citocinas e criando o quadro de inflamação basal crônica que observamos em indivíduos obesos (Kim *et al.*, 2012). Não observamos nenhuma diferença na concentração de citocinas proinflamatórias circulantes nos animais obesos, apesar da inflamação crônica característica da obesidade e dos efeitos antiinflamatórios dos compostos secundários do guaraná, as duas citocinas testadas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  permaneceram inalteradas.

### 5.4 Disbiose da Microbiota Intestinal

#### Conteúdo Cecal

Escolhemos as porções mais próximas do ceco para a análise devido à sua importância na manutenção na microbiota intestinal. Alguns autores acreditam que hoje o ceco funciona como uma reserva de microorganismos, formando uma "bolsa" na união do intestino grosso e delgado, essa estrutura anatômica teria a função importante na resiliência do ecossistema intestinal, recolonizando os intestinos em situações de disbiose (Donaldson *et al.*, 2015). O apêndice é uma porção anexa ao ceco, ainda mais distante do fluxo do bolo fecal, sendo mais resistente à disbiose. Ao contrário do que se imaginava anteriormente, o apêndice não é um órgão vestigial, visto que surgiu de maneira independente duas vezes ao longo da evolução nos mamíferos (Smith

### PARTE III

*et al.*, 2009). Talvez esse seja um dos motivos pelo qual o apêndice de animais herbívoros é mais desenvolvido que o dos humanos, visto que esses animais dependem totalmente da microbiota para a absorção de nutrientes da dieta. A importância dessa "reserva microbiana" é o motivo pelo qual escolhemos o conteúdo cecal em detrimento das fezes para fazer a análise da microbiota. Apesar das fezes serem um bom parâmetro para a microbiota intestinal, visto que passaram por todo trato gastrointestinal, o conteúdo cecal representa a porção resiliente da microbiota do hospedeiro.

Os dados advindos do sequenciamento podem ser expressos em abundância relativa, que leva em consideração a porcentagem do clado apresentado em relação ao número total de leituras ou podem ser expressos em abundância absoluta, que contabiliza o número total de leituras que aquele clado teve na amostra. Analisamos o número total de leituras, que é um bom parâmetro da quantidade de bactérias na amostra, e observamos que não há diferença no número de leituras entre todos os grupos. Para a análise estatística dos dados do sequenciamento utilizamos a abundância absoluta, tentando minimizar os erros, porém na parte gráfica alguns resultados estão representados com a abundância relativa para uma melhor visualização.

A diversidade do ecossistema microbiano decai ao longo da vida, (O'toole e Claesson, 2010) e também na obesidade (Ravussin *et al.*, 2012). sendo um importante parâmetro para a homeostase gastrointestinal (Lozupone *et al.*, 2012). Esperávamos uma perda na diversidade devido à dieta obesogênica, porém podemos observar que o tratamento com cafeína ou guaraná nos animais que receberam a dieta Chow também gera um decréscimo na diversidade bacteriana, essa perda de diversidade pode ser devido à propriedades antimicrobianas da cafeína e também do Guaraná.

Na análise dos filós podemos observar alterações decorrentes da dieta e alterações decorrentes dos tratamentos. Apesar de não haver diferença estatística quanto ao filo *Bacteroidetes*, a proporção *Bacteroidetes/Firmicutes* nos mostra claramente uma alteração nesses dois filós. Estudos mostram que a diminuição nessa proporção é uma das assinaturas microbianas observadas

### PARTE III

na obesidade (Turnbaugh *et al.*, 2009). Uma das causas dessa alteração é o consumo excessivo de calorias. O aumento no aporte calórico da dieta, mesmo em indivíduos não obesos, modula a microbiota, resultando em um ecossistema intestinal com proporção maior de *Firmicutes* e uma menor de *Bacteroidetes* (Jumpertz *et al.*, 2011).

Também é possível observar um aumento expressivo na abundância do filo *Proteobacteria* devido à dieta obesogênica, esse filo comporta uma grande quantidade de gêneros bacterianos potencialmente patogênicos, como *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio* e *Yersinia*. Estudos com cepas probióticas do gênero *Lactobacillus* mostram que essas bactérias inibem o crescimento de patógenos, o que poderia explicar em parte os valores mais altos do gênero *Escherichia* nos grupos Controle Ob e Cafeína Ob. O grupo Guaraná Ob apresentou níveis baixos do gênero *Escherichia*, mostrando que essa inibição pode ser por um mecanismo diferente, como por exemplo a atividade antimicrobiana dos outros compostos do guaraná.

Estudos *in vitro* com outros polifenóis incubados com um modelo de microbiota intestinal humana mostraram que esses são capazes de aumentar a proporção B/F e aumentar a abundância de *Bifidobacterium* (Parkar *et al.*, 2013). Nossos resultados mostraram uma resposta inversa, diminuindo a proporção B/F e a abundância de *Bifidobacterium*, mostrando que as alterações são dependentes dos polifenóis administrados, mas que esses dois parâmetros podem estar correlacionados. O gênero *Bifidobacterium* tem se provado como um dos grandes responsáveis pela maturação correta do sistema imune, exercendo um papel importante na microbiota intestinal, observamos que a abundância desse gênero diminui bastante com os tratamentos e também com a dieta obesogênica. Quanto à família que comporta esse gênero, *Bifidobacteriaceae*, observamos a maior diferença estatística entre os grupos, sendo quase extinta no tratamento com cafeína e Guarana, assim como na dieta obesogênica.

Estudos com populações humanas relacionaram a proporção do gênero *Bacteroides* à uma dieta rica em produtos de origem animal, e o gênero

### PARTE III

*Prevotella* à uma dieta rica em fibras (De Filippo *et al.*, 2010). Podemos observar que os animais que receberam a dieta obesogênica, rica em produtos de origem animal tiveram uma maior proporção do gênero *Bacteroides* e os animais que receberam a dieta Chow, rica em fibras, tiveram uma maior proporção do gênero *Prevotella*. Muitas das fibras vindas da dieta são metabolizadas pela microbiota, produzindo SCFA, como acetato, butirato e propionato (Topping, 1996). Essas moléculas sinalizadoras auxiliam a integridade da barreira intestinal e promovem a sensação de saciedade (Zaibi *et al.*, 2010; Macia *et al.*, 2015).

Bactérias do gênero *Mucispirillum* crescem no muco do epitélio intestinal e observamos um aumento em dietas ricas em gordura (Ravussin *et al.*, 2012), nossos resultados estão de acordo com outras dietas ricas em gordura, mas observamos que o tratamento com cafeína e guaraná diminuiu a abundância desse gênero.

Modelos *in vitro* mostram que alguns polifenóis, inclusive a catequina que está presente no extrato de Guaraná, tem a capacidade de inibir o crescimento tanto de *Firmicutes* quanto *Bacteroidetes*, acreditamos que as bactérias que não foram alteradas, ou que aumentaram a sua proporção são aquelas que melhor resistiram às propriedades antimicrobianas do extrato. *Lactobacillus*, por outro lado, recebem um estímulo positivo no crescimento quando cultivados com polifenóis *in vitro*, o que pode explicar o aumento na abundância desse gênero nos tratamentos cafeína e guaraná na dieta Chow.

Moléculas derivadas de *Lactobacillus* aumentam a concentração das enzimas GPx, CAT e SOD no soro de ratos (Zhang *et al.*, 2017), mesmo observando um aumento na quantidade de *Lactobacillus* nos tratamentos da dieta Chow, não observamos o aumento na atividade de nenhuma das enzimas nesses grupos.

Análises de microbiota são muitas vezes complexas de serem interpretadas, quando analisamos a figura dos filos, observamos um desbalanço causado pelo tratamento de cafeína e guaraná, tanto na dieta Chow quanto na dieta obesogênica. Quando analisamos os gráficos de

### PARTE III

*landscape*, as maiores alterações parecem ser devido à dieta. O gráfico de *landscape* foi montado com a abundância relativa dos gêneros bacterianos, que é o nível mais específico de identificação na técnica de sequenciamento que utilizamos. A ideia de que as alterações principais são devido à dieta fica mais evidente quando analisamos o gráfico de componentes principais, onde as amostras obesas se agrupam na parte direita do gráfico e as amostras da dieta Chow se agrupam na esquerda. A análise de clusterização também corrobora com essa ideia. Nessa análise traçamos a "assinatura microbiana" de cada amostra, utilizando inclusive fragmentos que não são identificados taxonomicamente, e comparamos a assinatura de cada amostra com todas as outras, agrupando-as por proximidade. A principal divisão agrupa todas as amostras dos grupos Chow de um lado, junto com uma amostra de cada tratamento Ob e o restante das amostras que receberam a dieta obesogênica do outro. Dentro do clado que agrupa a maioria das amostras do grupo Ob, podemos observar que não há um cluster represente Controle, Caféina ou Guaraná, especificamente; as amostras de diferentes tratamentos ficam intercaladas quanto à proximidade.

## 6. Conclusão

A dieta obesogênica padronizada de cafeteria foi eficiente em induzir um aumento no ganho de peso e no acúmulo de gordura, além de gerar uma disbiose na microbiota intestinal semelhante à que observamos na literatura, como a diminuição da proporção B/F, um aumento na abundância de *Mucilospirillum* e uma diminuição de *Bifidobacterium* e *Lactoacillus* apesar de não observarmos um aumento nos marcadores inflamatórios.

Tanto o tratamento com cafeína quanto com Guaraná foi capaz de modificar o ecossistema intestinal, porém os tratamentos não foram capazes de amenizar o ganho de peso ou o acúmulo de gordura, apesar de possuírem um efeito na microbiota intestinal.

## **7. Perspectivas**

Temos como perspectivas o aprimoramento das análises de microbiota através dos softwares já existentes, assim como os desenvolvidos no laboratório 32. Investigar os outros possíveis mecanismos de modulação da obesidade pelo Guaraná, que não são via microbiota. Testar um possível potencial antibiótico do extrato de Guaraná contra patógenos intestinais e otimizar a dieta padronizada para induzir obesidade.



## 8. Referências

AEBI, H. [13] Catalase in vitro. In: (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v.105, 1984. p.121-126. ISBN 0076-6879.

BACKHED, F. et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 3, p. 979-84, Jan 16 2007. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0605374104> >.

BEUTLER, B. A. TLRs and innate immunity. **Blood**, v. 113, n. 7, p. 1399-407, Feb 12 2009. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-07-019307> >.

BITTENCOURT LDA, S. et al. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) prevents beta-amyloid aggregation, generation of advanced glycation-end products (AGEs), and acrolein-induced cytotoxicity on human neuronal-like cells. **Phytother Res**, v. 28, n. 11, p. 1615-24, Nov 2014. ISSN 0951-418x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.5173> >.

BORTOLIN, R. C. **Desenvolvimento de uma nova dieta indutora de obesidade e avaliação do potencial do guaraná (*Paullinia cupana*) como agente terapêutico no tratamento da obesidade e síndromes associadas**. 2018. 176 (Tese de Doutorado). Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

BORTOLIN, R. C. et al. A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. **Int J Obes (Lond)**, Sep 12 2017. ISSN 0307-0565. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ijo.2017.225> >.

BRANISTE, V. et al. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. **Sci Transl Med**, v. 6, n. 263, p. 263ra158, Nov 19 2014. ISSN 1946-6234. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.3009759> >.

BRESLIN, P. A. S. An Evolutionary Perspective on Food and Human Taste. **Current Biology**, v. 23, n. 9, p. R409-R418, 2013/05/06/ 2013. ISSN 0960-9822. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982213004181> >.

CANI, P. D. et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1470-81, Jun 2008. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2337/db07-1403> >.

DE FILIPPO, C. et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proc Natl Acad Sci U S A**,

### PARTE III

v. 107, n. 33, p. 14691-6, Aug 17 2010. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1005963107> >.

DESANTIS, T. Z. et al. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. 2006-07-01 2006. Disponível em: < <http://aem.asm.org/content/72/7/5069.short> >.

DONALDSON, G. P.; LEE, S. M.; MAZMANIAN, S. K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 20, 2015-10-26 2015. ISSN 1740-1534/1740-1534. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/nrmicro3552> >.

DYALL, S. D.; BROWN, M. T.; JOHNSON, P. J. Ancient Invasions: From Endosymbionts to Organelles. 2004-04-09 2004. Disponível em: < <http://science.sciencemag.org/content/304/5668/253> >.

EDGAR, R. C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. **Nature Methods**, v. 10, n. 10, p. 996, 2013-08-18 2013. ISSN 1548-7105/1548-7105. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/nmeth.2604> >.

GASPAROTTO, J. et al. Coal and tire burning mixtures containing ultrafine and nanoparticulate materials induce oxidative stress and inflammatory activation in macrophages. **Sci Total Environ**, v. 463-464, p. 743-53, Oct 1 2013. ISSN 0048-9697. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.086> >.

GILL, S. R. et al. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. **Science**, v. 312, n. 5778, p. 1355-9, Jun 2 2006. ISSN 0036-8075 (Print)/1095-9203 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/science.1124234> >.

GONUL, N. et al. The role of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and OGG1 polymorphisms in type 2 diabetes mellitus risk: a case-control study in a Turkish population. **Gene**, v. 505, n. 1, p. 121-7, Aug 15 2012. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.05.025> >.

GRENHAM, S. et al. Brain-gut-microbe communication in health and disease. **Front Physiol**, v. 2, p. 94, 2011. ISSN 1664-042x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2011.00094> >.

**Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.** 2010. Disponível em: < [https://books.google.com/books/about/Guide\\_for\\_the\\_Care\\_and\\_Use\\_of\\_Laboratory.html?hl=pt-BR&id=Vp5mgXtxYdQC](https://books.google.com/books/about/Guide_for_the_Care_and_Use_of_Laboratory.html?hl=pt-BR&id=Vp5mgXtxYdQC) >.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Assays for differentiation of glutathione S-Transferases. In: (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v.77, 1981. p.398-405. ISBN 0076-6879.

### PARTE III

HARVEY, W. **On Corpulence in Relation to Disease**. 1872. Disponível em: < [https://books.google.com/books/about/On\\_Corpulence\\_in\\_Relation\\_to\\_Disease.html?hl=pt-BR&id=4RUDAAAAQAAJ](https://books.google.com/books/about/On_Corpulence_in_Relation_to_Disease.html?hl=pt-BR&id=4RUDAAAAQAAJ) >.

HASLAM, D. W.; JAMES, W. P. Obesity. **Lancet**, v. 366, n. 9492, p. 1197-209, Oct 1 2005. ISSN 0140-6736. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)67483-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(05)67483-1) >.

JUMPERTZ, R. et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. **Am J Clin Nutr**, v. 94, n. 1, p. 58-65, Jul 2011. ISSN 0002-9165. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.110.010132> >.

KIM, K. A. et al. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47713, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0047713> >.

KREWER CDA, C. et al. Habitual intake of guarana and metabolic morbidities: an epidemiological study of an elderly Amazonian population. **Phytother Res**, v. 25, n. 9, p. 1367-74, Sep 2011. ISSN 0951-418x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.3437> >.

LECHUGA-SANCHO, A. M. et al. Obesity induced alterations in redox homeostasis and oxidative stress are present from an early age. **PLoS One**, v. 13, n. 1, p. e0191547, 2018. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0191547> >.

LIMA, N. et al. Modulatory Effects of Guarana (*Paullinia cupana*) on Adipogenesis. **Nutrients**, v. 9, n. 6, p. 635, 2017-06-20 2017. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/2072-6643/9/6/635/htm> >.

LOZUPONE, C. A. et al. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 220-30, Sep 13 2012. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature11550> >.

LUCZYNSKI, P. et al. Growing up in a Bubble: Using Germ-Free Animals to Assess the Influence of the Gut Microbiota on Brain and Behavior. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 19, n. 8, Aug 2016. ISSN 1461-1457. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/ijnp/pyw020> >.

MACIA, L. et al. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. **Nat Commun**, v. 6, p. 6734, Apr 1 2015. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms7734> >.

### PARTE III

MARTEL, J. et al. Anti-obesogenic and antidiabetic effects of plants and mushrooms. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 3, p. 149, 2016-09-16 2016. ISSN 1759-5037/1759-5037. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/nrendo.2016.142> >.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. 1972-05-25 1972. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/247/10/3170.short> >.

MORRISON, D. J.; PRESTON, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. **Gut Microbes**, v. 7, n. 3, p. 189-200, May 3 2016. ISSN 1949-0976. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082> >.

O'TOOLE, P. W.; CLAEISSON, M. J. Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 4, p. 281-291, 2010/04/01/ 2010. ISSN 0958-6946. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694609002180> >.

PARK, E. J. et al. Dietary and Genetic Obesity Promote Liver Inflammation and Tumorigenesis by Enhancing IL-6 and TNF Expression. **Cell**, v. 140, n. 2, p. 197-208, 2010/01/22/ 2010. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867409016389> >.

PARKAR, S. G.; TROWER, T. M.; STEVENSON, D. E. Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota. **Anaerobe**, v. 23, p. 12-19, 2013/10/01/ 2013. ISSN 1075-9964. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996413001303> >.

POSADZKI, Paul; WATSON, Leala K.; ERNST, Edzard. Adverse effects of herbal medicines: an overview of systematic reviews. **Clinical medicine**, v. 13, n. 1, p. 7-12, 2013.

PYLRO, V. S. et al. BMPOS: a Flexible and User-Friendly Tool Sets for Microbiome Studies | SpringerLink. 2016. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00248-016-0785-x> >.

RAVUSSIN, Y. et al. Responses of gut microbiota to diet composition and weight loss in lean and obese mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 20, n. 4, p. 738-47, Apr 2012. ISSN 1930-7381. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/oby.2011.111> >.

SAAD, Bashar et al. Anti-obesity Medicinal Plants. In: **Anti-diabetes and Anti-obesity Medicinal Plants and Phytochemicals**. Springer, Cham, 2017. p. 59-93.

### PARTE III

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. In: (Ed.). **PLoS Biol**, v.14, 2016. ISBN 1544-9173 (Print)1545-7885 (Electronic).

SMITH, H. F. et al. Comparative anatomy and phylogenetic distribution of the mammalian cecal appendix. **J Evol Biol**, v. 22, n. 10, p. 1984-99, Oct 2009. ISSN 1010-061x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1420-9101.2009.01809.x> >.

SMITH, N.; ATROCH, A. L. Guarana's Journey from Regional Tonic to Aphrodisiac and Global Energy Drink. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 7, n. 3, p. 279-82, Sep 2010. ISSN 1741-427x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nem162> >.

TOPPING, D. L. Short-chain fatty acids produced by intestinal bacteria. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 5, n. 1, p. 15-9, Mar 1996. ISSN 0964-7058 (Print)0964-7058. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TURNBAUGH, P. J. et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 480-4, Jan 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19043404> >.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. In: (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v.77, 1981. p.325-333. ISBN 0076-6879.

ZAIBI, M. S. et al. Roles of GPR41 and GPR43 in leptin secretory responses of murine adipocytes to short chain fatty acids. **FEBS Lett**, v. 584, n. 11, p. 2381-6, Jun 3 2010. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.027> >.

ZHANG, J. et al. Antioxidant status and gut microbiota change in an aging mouse model as influenced by exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibetan kefir. **J Dairy Sci**, v. 100, n. 8, p. 6025-6041, Aug 2017. ISSN 0022-0302. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-12480> >.