



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS



ANGIE PAOLA TRIANA NARVAEZ

**EFEITOS DE UMA DIETA ALTAMENTE PALATÁVEL E RICA
EM ALIMENTOS ULTRAPROCESSADOS SOBRE O
METABOLISMO ENERGÉTICO E COMPOSIÇÃO DA
MICROBIOTA INTESTINAL**

Limeira
2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS



ANGIE PAOLA TRIANA NARVAEZ

**EFEITOS DE UMA DIETA ALTAMENTE PALATÁVEL E RICA
EM ALIMENTOS ULTRAPROCESSADOS SOBRE O
METABOLISMO ENERGÉTICO E COMPOSIÇÃO DA
MICROBIOTA INTESTINAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial para a obtenção do título de
Bacharel em nutrição à Faculdade de Ciências
Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Patricia de O. Prada

Limeira
2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Sueli Ferreira Júlio de Oliveira - CRB 8/2380

N169e Narvaez, Angie Paola Triana, 1997-
Efeitos de uma dieta altamente palatável e rica em alimentos ultraprocessados sobre o metabolismo energético e composição da microbiota intestinal / Angie Paola Triana Narvaez. – Limeira, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Patricia de Oliveira Prada.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Obesidade. 2. Microbioma gastrointestinal. 3. Dieta de cafeteria. I. Prada, Patricia de Oliveira, 1971-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações adicionais, complementares

Título em outro idioma: Effects of a highly palatable diet enrich in ultra-processed foods on energy, metabolism and gut microbiota composition

Palavras-chave em inglês:

Obesity

Gastrointestinal microbiome

Cafeteria diet

Titulação: Bacharel em Nutrição

Data de entrega do trabalho definitivo: 13-01-2021

Autor: Angie Paola Triana Narváez

Título: Efeitos de uma dieta altamente palatável e rica em alimentos ultraprocessados sobre o metabolismo energético e composição da microbiota intestinal.

Natureza: Trabalho de Conclusão de Curso em nutrição

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas

Aprovado em: 13/01/2012

BANCA EXAMINADORA



Prof(a). Dr(a). Patrícia de Oliveira Prada (Orientador(a)) – Presidente
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)



Prof(a). Dr(a). Marclane Milanski Ferreira – Avaliador
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

Este exemplar corresponde à versão final da monografia aprovada.



Prof(a). Dr(a). Patrícia de Oliveira Prada (Orientador(a))
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Deus, pela minha vida, e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho.

Aos meus pais, Marco e Aura, e meu irmão Marco, que me ajudaram e aconselharam, que me incentivaram nos momentos difíceis e em cada etapa da minha vida fazendo possível a realização deste trabalho assim como tudo que tenho conseguido.

Aos meus familiares paternos, maternos e agregados, por estarem sempre presentes e torcendo pelo meu sucesso.

Aos amigos, que sempre me apoiaram e torceram por mim, estiveram do meu lado e me ajudaram em cada passo que eu dava, em especial um agradecimento a Isabelli Lourençon, Isabel Vieira, Vanessa Matos, Giovanna Menicheli e Gabriel Gastaldi, por tornarem a minha graduação a melhor fase.

Aos companheiros do laboratório LabIMO por toda ajuda, conselhos e dedicação.

À minha orientadora Profa. Dra. Patricia O. Prada pela orientação ao longo de 2 iniciações científicas e o TCC, por todo o auxílio, conselhos e motivação para persistir sempre. Sem ela minha graduação não seria a mesma.

Por fim, agradecer a todos que tive a chance de conhecer ao longo da graduação.

Para conhecermos os amigos é necessário passar pelo sucesso e pela desgraça.
No sucesso, verificamos a quantidade e, na desgraça, a qualidade.
-Confúcio

NARVAEZ, A. P. T. Efeitos de uma dieta altamente palatável e rica em alimentos ultraprocessados sobre o metabolismo energético e composição da microbiota intestinal. 2020. n.ºf. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em nutrição.) – Faculdade de Ciências Aplicadas. Universidade Estadual de Campinas. Limeira, 2020.

RESUMO

As doenças cardiometabólicas apresentam repercussões negativas na saúde pública mundial, sendo causadoras de óbitos na sociedade ocidental. A alimentação tem um papel crucial tanto na gênese dessas doenças quanto na determinação da microbiota intestinal. Dietas com excesso de açúcares refinados, alimentos ultraprocessados, sal e gordura saturada têm sido associadas com desbalanço energético e disbiose. Contudo, o conhecimento de como esses fatores se entrelaçam ainda está por ser definido. O presente estudo visa avaliar como uma dieta rica em gordura, açúcares e alimentos ultraprocessados chamada de cafeteria (CAF) ou western-diet altera a homeostase energética, metabolismo da glicose e insulina, as concentrações séricas de leptina e lipopolissacáride (LPS), assim como a composição da microbiota intestinal. Para atingir os objetivos foi administrada aos camundongos C57BL/6J uma dieta CAF, contendo pellets feitos com amendoim torrado, chocolate, biscoito maisena e ração padrão, além de oferta adicional de bolo de abacaxi, salgadinhos e refrigerante ao longo de 14 semanas. Foram mensurados o peso corporal, massa adiposa, glicemia de jejum, teste de tolerância à insulina (ITT) e à glicose (GTT), dosagens por ELISA de leptina e LPS séricos e a caracterização metagenômica da microbiota intestinal. Após as 14 semanas, os animais alimentados com a dieta ultraprocessada tiveram um aumento significativo ($p < 0,05$) da massa corpórea, adiposa e leptina sérica quando comparados aos animais controles que receberam dieta padrão, sugerindo que a dieta cafeteria foi eficaz em aumentar a adiposidade. O ITT não foi diferente entre os dois grupos, entretanto, o GTT demonstrou uma intolerância à glicose. A glicemia jejum no grupo com dieta CAF foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que o grupo controle. Os níveis séricos de LPS foram elevados ($p < 0,05$) nos animais que receberam a dieta CAF. A análise metagenômica da microbiota intestinal demonstrou um aumento das espécies *Bacteroides dorei*, *bacteroides vulgatus* e *Bacteroides xylanisolvens* enquanto as espécies *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus taiwanensis*, *Lactobacillus reuteri* e *Blautia hydrogenotrophica* estavam reduzidas significativamente ($p < 0,05$) nos animais em dieta CAF em comparação com o grupo em dieta padrão. Em conjunto, os resultados sugerem que uma dieta rica em gordura, açúcares refinados e alimentos ultraprocessados consumida por 14 dias induz hiperfagia, obesidade e um quadro de pré-diabetes. O maior nível sérico de leptina dos animais em dieta CAF reforça o aumento da adiposidade e sugere que esses animais devem apresentar resistência hipotalâmica à leptina, o que explicaria a hiperfagia. O aumento dos níveis de LPS sérico e das bactérias gram-negativas no intestino podem atuar como mecanismos ligados a gênese da obesidade e pré-diabetes do grupo que recebeu a dieta cafeteria.

Palavras-chave: Obesidade, microbiota intestinal, dieta cafeteria, alimentos ultraprocessados, LPS.

NARVAEZ, A. P. T. Effects of a highly palatable diet enrich in ultra-processed foods on energy metabolism and gut microbiota composition. 2020. nºf. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em nutrição.) – Faculdade de Ciências Aplicadas. Universidade Estadual de Campinas. Limeira, 2020.

ABSTRACT

Cardiometabolic diseases have negative repercussions on public health worldwide, being the cause of a large number of deaths in Western society. Unhealthy eating is involved both in the genesis of these diseases and in determining the gut microbiota's composition. Studies have shown that diets high in refined sugars, ultra-processed foods, salt, and saturated fat are associated with energy imbalance and dysbiosis. However, the knowledge of how these factors intertwine is yet to be defined. The present study aims to evaluate how high fat and refined sugars diets and increased ultra-processed foods known as cafeteria diet (CAF) or Western diet alters energy homeostasis, glucose and insulin metabolism, such as serum concentrations of leptin and lipopolysaccharide (LPS), as well as the composition of the gut microbiota. To achieve these goals, C57BL/6J mice received a CAF diet containing pellets enriched with roasted peanuts, chocolate, cornstarch biscuit, and standard chow, besides an additional offer of pineapple cake, snacks, and soda over 14 weeks. Body mass, adipose mass, fasting glycemia, insulin tolerance test (ITT) and glucose (GTT), ELISA assays of leptin and LPS were measured, and the metagenomic characterization of the gut microbiota. After 14 weeks on the CAF diet or chow, mice displayed increased ($p < 0.05$) body mass, adipose mass, and leptin levels compared to mice on the chow diet, suggesting that the CAF was effective in increasing adiposity. ITT was not different between the two groups. However, GTT demonstrated glucose intolerance. Fasting blood glucose in the CAF diet group was significantly higher ($p < 0.05$) than in the control group. Serum LPS levels were high ($p < 0.05$) in the animals receiving the CAF diet. Metagenomic analysis of the gut microbiota demonstrated an increase in the *Bacteroides dorei*, *Bacteroides vulgatus*, and *Bacteroides xylanisolvens* species. Contrary, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus taiwanensis*, *Lactobacillus reuteri*, and *Blautia hydrogenotrophica* were significantly reduced ($p < 0.05$) in CAF diet animals compared to the group on a chow diet. Together, the results suggest that high fat, and refined sugars, including ultra-processed foods consumed for 14 days, induces hyperphagia, obesity, and a pre-diabetes condition. The higher leptin level of mice on the CAF diet reinforces the increase in adiposity and suggests that these animals should have hypothalamic leptin resistance, which explains hyperphagia. Increased LPS levels and gram-negative bacteria in the gut may be behind the genesis of obesity and pre-diabetes in the group that received a cafeteria diet

Keywords: Obesity, gut microbiota, cafeteria diet, ultra-processed foods, LPS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: (A) Massa corpórea e (B) massa adiposa dos grupos alimentados com dieta padrão ou ultraprocessada	18
Figura 2: Ingestão alimentar dos grupos alimentados com dieta padrão ou ultraprocessada	19
Figura 3 Teste de tolerância a insulina (ITT) dos grupos alimentados com dieta padrão ou ultraprocessada.	20
Figura 4: Teste de tolerância a glicose (GTT) (A) e glicemia de jejum (B) dos grupos alimentados com a dieta ultraprocessada ou com dieta padrão para camundongos.....	21
Figura 5: Determinação da leptina dos grupos alimentados com dieta padrão ou ultraprocessada	22
Figura 6: Análise do LPS circulante realizado no soro dos grupos alimentados com a dieta rica em gordura, ultraprocessada ou com dieta padrão para camundongos.	23
Figura 7: Análise metagenômica da microbiota intestinal dos grupos alimentados com dieta padrão ou ultraprocessada (A) <i>Bacteroides dorei</i> , (B) <i>Bacteroides vulgatus</i> , (C) <i>Lactobacillus johnsonii</i> (D) <i>Bacteroides xylanisolvens</i> , (E) <i>Lactobacillus taiwanensis</i> , (F) <i>Lactobacillus reuteri</i> e (G) <i>Blautia hydrogenotrophica</i>	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAF	Dieta de cafeteria
DIO	Diet-induced obesity
DM2	Diabetes mellitus 2
GTT	Teste de tolerância à glicose
HF	High-fat diet
IL-12	Interleucina 12
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IP	Intraperitoneal
ITT	Teste de tolerância à insulina
LBP	LPS binding protein
LPS	Lipopolissacarídeos
SCFA	Short Chain Fatty Acids
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
2.	OBJETIVOS.....	14
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1.	ANIMAIS E DIETA.....	15
3.2.	GLICEMIA DE JEJUM, TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT) E TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT).....	16
3.3.	DOSAGENS POR ELISA DE LEPTINA E LPS.....	16
3.4.	EXTRAÇÃO DE FEZES PARA A EXTRAÇÃO DE DNA.....	16
3.5.	CARACTERIZAÇÃO METAGENÔMICA.....	17
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5.	CONCLUSÃO.....	26
6.	REFERENCIAS.....	28

1. INTRODUÇÃO

A obesidade, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) representa um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, sendo que em 2019, cerca de 38,2 milhões de crianças com menos de 5 anos estavam com sobrepeso ou obesas (OMS, 2019). No Brasil, dois em cada 10 brasileiros está acima do peso, aumentando de 11,8% da população em 2006 para 20,3% em 2019 (VIGITEL 2019). Esse crescimento nos números tem sido justificado principalmente pela mudança nos padrões alimentares, com aumento do consumo de uma alimentação desbalanceada (MYLES, 2014). Uma das principais preocupações a respeito da obesidade são as doenças crônicas associadas a ela, tais como diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares (MELO, 2011).

A microbiota intestinal vem sendo estudada como um importante regulador do balanço energético e sua alteração, conhecida como disbiose está associada à gênese da obesidade. A microbiota intestinal contém mais de 1 trilhão de microrganismos, sendo composta por vírus, fungos e principalmente por bactérias. Das diferentes cepas de bactérias comensais no corpo humano, a grande maioria inclui as espécies Firmicutes (Gram negativas), Bacteroidetes (Gram positivas), Verrucomicrobia (Gram negativas), Actinobactérias (Gram positivas) e Proteobactérias (Gram negativas) (NAPOLITANO; COVASA, 2020). Dessas cinco espécies, a mais abundante é Firmicutes, abrangendo quase 65% de toda a flora (NAPOLITANO & COVASA, 2020). Para cada indivíduo 2/3 desses microrganismos diferem do resto da população, tornando a microbiota algo único, sendo afetada por fatores como dieta, ambiente e genética (THURSBY, JUGE 2017). É sabido que a microbiota intestinal desempenha um importante papel na saúde do corpo humano atuando no desenvolvimento e regulação do sistema imune, proteção contra diversos patógenos, execução de funções essenciais na digestão e metabolismo, além de interferir no humor e comportamento (PATTERSON et al., 2016). Assim, se ocorrer um desequilíbrio na composição dessas bactérias em resposta à alimentação, por exemplo, pode causar doenças agudas e/ou crônicas (SCHNORR et al., 2016).

A alimentação desempenha um papel crucial na diversidade da microbiota intestinal. Ao longo de gerações, parte da diversidade da microbiota intestinal foi sendo modificada ou perdida acompanhando as mudanças de padrões de vida da

sociedade industrializada (NAPOLITANO & COVASA, 2020). Estudos demonstraram que existe uma diferença entre a microbiota intestinal de indivíduos que consomem uma dieta rica em gorduras e pobre em fibras e de indivíduos que consomem uma dieta rica em fibras (BIBBÒ et al., 2016; NAPOLITANO & COVASA, 2020). Foi observado um aumento da população de bacteroides quando a dieta era reduzida em carboidratos e também com as dietas com alto teor de gordura e de proteína animal (NAPOLITANO & COVASA, 2020). Dietas ricas em alimentos processados, gordura saturada, açúcares de adição e reduzida em fibras, comumente chamadas *western-diets*, estão associadas a disbiose intestinal com redução da diversidade de bactérias, aumentando populações como *Bilophila wadsworthia*, *Alistipes putredinis* e *Bacteroidetes* e diminuindo a população de Firmicutes (REQUENA et al., 2018).

Por outro lado, dietas balanceadas em relação a macro e micronutrientes e ricas em fibras são associadas ao aumento da síntese de ácidos graxos de cadeia curta (*short chain fatty acids*, ou, SCFA) como o acetato, butirato e propionato, que possuem efeitos benéficos para as células intestinais, auxiliam na regulação da imunidade, na integridade da barreira intestinal, na produção de hormônios e lipogênese, atuando como sinalizadores moleculares para manter a homeostasia (REQUENA et al., 2018). Dessa forma, a *western-diet* favoreceria uma microbiota intestinal com pouca diversidade, propiciando a proliferação de bactérias gram negativas como por exemplo a Enterobacteriaceae. As bactérias gram-negativas possuem lipopolissacarídeos (LPS) em sua parede, assim quando são degradadas liberam o LPS no intestino que pode ser absorvido. A sua absorção intestinal é facilitada quando há presença de uma dieta rica em lipídeos, promovendo o aumento da concentração de LPS na corrente sanguínea (BATTSON, 2017). O LPS é o principal agonista do receptor TLR4 (*Toll-like receptor 4*) localizado na membrana de todas as células e de células imunes, como macrófagos. É transportado no sangue pela *Lps binding protein* (LBP) e se liga ao TLR4 ativando vias de sinalização intracelulares, que controlam a síntese de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF α (fator de necrose tumoral alfa), IL-1 β (Interleucina 1 beta), IL-6 (Interleucina 6), IL-8 (Interleucina 8), e IL-12 (Interleucina 12), que, por sua vez, atuam como mediadores inflamatórios (ROGERO; CALDER, 2018). A inflamação subclínica desencadeada pelo aumento dos níveis circulantes de LPS desencadeia e amplifica o risco de doenças cardiovasculares e DM2 (ROGERO; CALDER, 2018).

Para melhor entendimento dos efeitos de dietas sobre a microbiota intestinal, vêm sendo utilizados diferentes modelos experimentais, entre eles os modelos de *diet-induced obesity* (DIO) (BORTOLIN, 2017). A “dieta de cafeteria” (CAF) se destaca entre eles, já que, diferentemente das dietas *high-fat diet* (HF) utilizadas tradicionalmente (BAGAROLLI, 2017), ela não faz a substituição das calorias provenientes de carboidratos por calorias provenientes de gordura. A CAF se baseia na utilização de uma variedade de alimentos de alta palatabilidade e alta carga energética, como os alimentos processados e ultraprocessados, para simular de uma forma mais autêntica a dieta ocidental, levando os roedores a estados de obesidade, dislipidemia, resistência à insulina, inflamação crônica tecidual e hipertensão (PRADA et al., 2005; SAMPEY et al., 2011). Entretanto, os achados na literatura não são uniformes quando se trata do estudo da microbiota intestinal e sua modulação por meio de dieta hiperlipídica e/ou cafeteria por apresentarem diferenças na metodologia e no sujeito estudado (PRADA et al., 2005; WU et al., 2011; BAGAROLLI, 2017).

Sendo assim, o presente projeto visa investigar: 1) as alterações na composição corporal; 2) as alterações nas concentrações séricas de leptina e LPS; 3) as possíveis alterações no metabolismo de glicose e insulina e 4) as alterações na composição da microbiota intestinal (espécies) em camundongos alimentados por 14 dias com uma dieta CAF, a fim de contribuir para a elucidação dos efeitos de um padrão alimentar com predominância de alimentos ultraprocessados altamente palatáveis e rico em açúcares e gorduras saturadas, sobre a microbiota intestinal, homeostase energética e metabólica.

2. OBJETIVOS

1) Avaliar as alterações na evolução ponderal, massa adiposa e ingestão alimentar dos camundongos mediante o consumo de dieta de cafeteria ou dieta padrão.

2) Avaliar as alterações nas concentrações séricas de leptina e LPS nos 2 grupos descritos acima.

3) Avaliar as alterações no metabolismo de glicose e de insulina nos 2 grupos descritos acima.

4) Avaliar a composição da microbiota intestinal nos 2 grupos descritos acima.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais e dieta

Os camundongos utilizados foram fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp CEMIB/UNICAMP (CEUA 4920-1/2018), sendo estes da linhagem C57BL/6J, machos com 8 semanas de idade. Os animais permaneceram acondicionados em ambiente mantido a 22°C, com ciclos escuro - claro fixos (12/12 horas), recebendo água potável e dieta *ad libitum*.

Os camundongos foram divididos em dois grupos, um grupo com consumo inicial de dieta padrão Nuvilab CR1 e o outro grupo com consumo inicial de dieta de cafeteria durante 12 semanas. Foi feita a medida da evolução ponderal de cada grupo semanalmente e da ingestão alimentar duas vezes por semana. A dieta foi trocada de duas a três vezes por semana mantendo as qualidades sensoriais dos alimentos. A ingestão de alimentos foi determinada pela diferença de peso entre o alimento oferecido e o restante. O consumo de energia foi calculado usando o conteúdo energético de cada alimento (kcal/g).

A dieta padrão consistiu em uma dieta Nuvilab CR1, contendo por peso 57% de carboidrato, 22% de proteína e 4% de lipídios, tendo aproximadamente 3,8 kcal por grama, acompanhada de água potável oferecida num bebedouro. A dieta de cafeteria consistiu em ração padrão (Nuvilab), acrescida de amendoim, chocolate e biscoito maisena os quais foram moídos para então se confeccionar os pallets antes de oferecer para os animais (PRADA, et al., 2005). Os animais em dieta cafeteria receberam Coca-Cola, deixada em agitador magnético durante 6 h a temperatura ambiente para a remoção do gás. Além disso, os animais tiveram livre acesso a bolo industrializado à base de farinha de trigo refinada no sabor abacaxi e salgadinho industrializado sabor bacon (sendo estes dois últimos itens definidos a partir de testes de preferência conduzidos anteriormente em nosso grupo de pesquisa, dados não mostrados) totalizando 5,4 kcal/g (carboidrato, 38,5%; proteína, 15%; gordura, 46,5%) em oposição aos 3,8 kcal/g (carboidrato, 70%; proteína, 20%; gordura, 10%) da dieta padrão (PRADA, et al., 2005).

3.2. Glicemia de jejum, teste de tolerância à insulina (ITT) e tolerância à glicose (GTT)

Ao final de 14 semanas os animais dos grupos dieta padrão e dieta cafeteria foram realizar o ITT e GTT como descrito abaixo. A coleta do sangue foi feita na ponta da cauda dos animais e uma alíquota de 20 microlitros foi destinada a medida da glicemia através de fitas reativas medidas em glicosímetro. A sensibilidade à insulina foi avaliada após jejum de 6 horas realizado no período diurno das 8 h as 14 h, através do teste de tolerância a insulina (ITT). No teste, houve a coleta de sangue para a dosagem da glicemia no tempo zero ou basal. Após essa medida, a insulina regular na dose de 1,0 UI/kg foi administrada por via intraperitoneal (IP) e o sangue foi coletado pela ponta da cauda nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos.

Para o teste de tolerância à glicose (GTT), foi realizado um jejum de 12 horas durante a noite, e após a medida da glicemia basal, foi administrada uma solução de glicose de 1,0 g/kg via intraperitoneal (IP). Após, o sangue foi coletado ao longo de 2 horas, nos tempos 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min. Os níveis de glicemia após a administração de glicose foram avaliados.

3.3. Dosagens por ELISA de leptina e LPS

Durante a eutanásia dos animais, foram coletados sangue dos camundongos de todos os grupos para obtenção do soro e posterior dosagem de leptina e LPS com os kits de ELISA (#EZML-82K from Millipore e Limulus Amebocyte Assay-Lonza, respectivamente) comercialmente disponíveis, seguindo o protocolo do fabricante.

3.4. Extração de fezes para a extração de DNA

Os animais de todos os grupos foram anestesiados por meio da administração intraperitoneal com a mistura de cetamina (300 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg) e a perda dos reflexos pedal e corneano foi utilizada como controle da anestesia. Após, foram sacrificados por decapitação. Abriu-se o cólon por meio de um corte longitudinal e as fezes da porção final do cólon foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido (-80°C) até o seu uso para posterior processamento.

3.5. Caracterização metagenômica

O DNA genômico microbiano foi extraído das fezes e coletadas anteriormente da porção final do colón, usando o mini kit específico da Qiagen (Hilden, Germany) conforme a amostra inicial utilizada. O DNA ser foi quantificado e utilizado para amplificar as regiões V2-V3 do gene 16S rRNA. A amplificação resultante do PCR, os amplicons de PCR obtidos por pirosequenciamento e a qualidade dos controles foram realizados de acordo com protocolo prévio (CHAKRAVORTY, 2007). As amostras foram então sequenciadas em GS FLX Titanium utilizando o kit GS FLX Titanium PicoTiterPlate combinado com o kit de sequenciamento Titanium GS FLX XLR70 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Os resultados obtidos a partir do sequenciamento foram analisados por bioinformática utilizando a ferramenta básica de busca de alinhamento local X (BLASTX), observada com o software METAREP, e comparadas de acordo com a prevalência de filo entre os grupos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

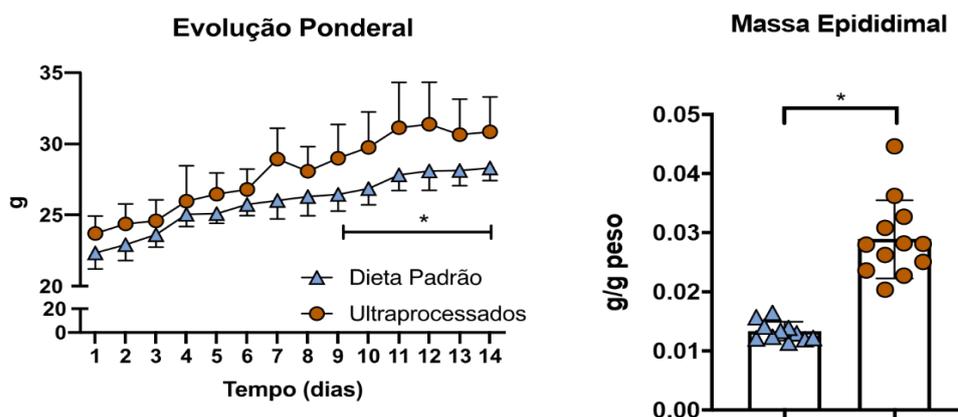
No presente estudo, avaliamos as alterações na composição corporal e no metabolismo de glicose, insulina, níveis séricos de leptina e LPS e a composição da microbiota intestinal de camundongos alimentados durante um período de 14 semanas com dieta CAF e padrão.

Mudanças nos hábitos alimentares, incluindo o aumento do consumo de alimentos ricos em calorias, são fatores relacionados ao aumento da prevalência da obesidade no mundo (NILSSON, 2011). Diferentes modelos experimentais de dieta são utilizados para induzir obesidade em camundongos a fim de avaliar as modificações no metabolismo e os mecanismos subjacentes de distúrbios metabólicos que estão presentes durante a supernutrição (NILSSON, 2011). Dentre essas dietas, a dieta cafeteria se destaca por ser mais semelhante a dieta humana comumente utilizada principalmente no ocidente (*western-diet*) e por não substituir as calorias provenientes de carboidratos por calorias provenientes de gordura (MARTIRE et al., 2013) como ocorre por exemplo nos modelos que utilizam a dieta hiperlipídica ou *high fat diet*. Deste modo, os resultados obtidos utilizando dieta cafeteria para induzir

obesidade parecem mais alinhados com os padrões alimentares observados em humanos (MARTIRE et al., 2013; SAMPEY et al., 2011).

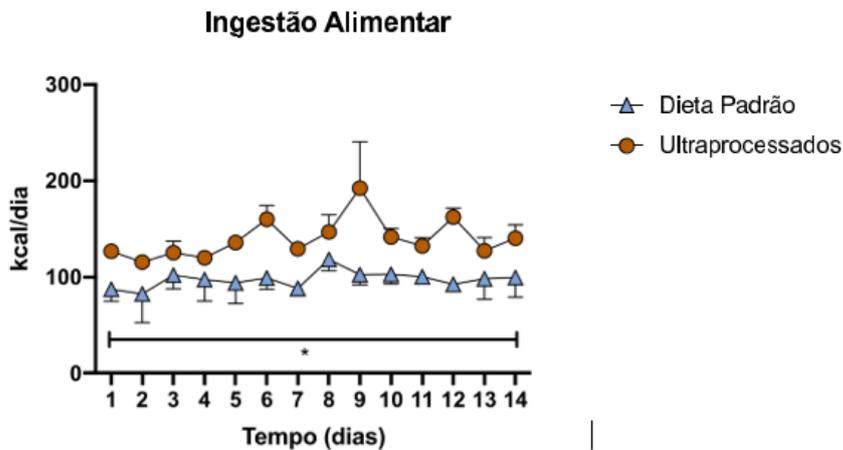
A evolução ponderal revelou que os animais alimentados com a dieta rica em gordura, açúcar e alimentos ultraprocessados aumentou significativamente ($p < 0,05$) a massa corpórea comparados aos animais controles que receberam dieta padrão (**Figura 1A**). Houve também aumento significativo ($p < 0,05$) da massa adiposa (**Figura 1B**) no grupo alimentado com dieta cafeteria. Sugerindo que a dieta cafeteria foi eficaz em aumentar a adiposidade dos animais comparados aos seus controles que receberam dieta padrão. Esses dados estão de acordo com a literatura onde um aumento do peso corporal e da massa adiposa da região peri-epididimal após consumo de dieta altamente palatáveis foram observados (ZEENI et al., 2013).

Figura 1: (A) Massa corpórea e (B) massa adiposa dos grupos alimentados com dieta padrão ou ultraprocessada durante 14 semanas. Valores apresentados como média \pm desvio padrão; $n=8$ para cada grupo. Two-Way ANOVA com post test Bonferroni para analisar (A) e teste T de student para analisar (B) foram utilizados para a análise estatística.



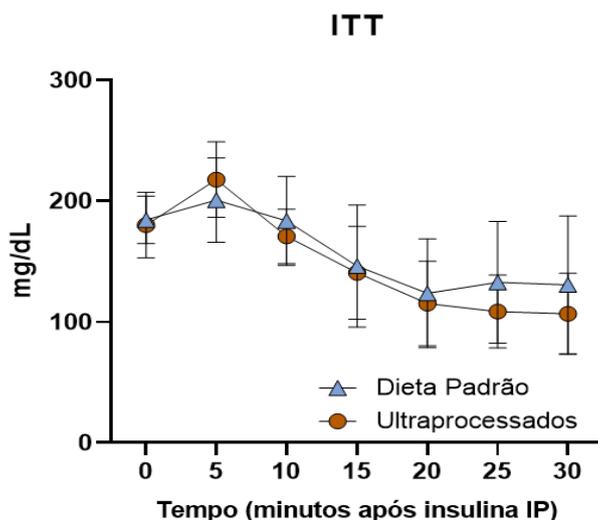
O aumento de adiposidade pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo consumo maior de kcal pelo grupo alimentado com dieta cafeteria devido a uma dieta rica em alimentos ultraprocessados (**Figura 2**). Este resultado está de acordo com outro estudo, onde a dieta CAF induziu a hiperfagia contínua e aumento do consumo de energia (OLIVA et al., 2017). O aumento no consumo alimentar por parte dos camundongos em dieta CAF pode ser explicado devido à elevada palatabilidade da dieta. Na literatura é sugerido que o alimento altamente palatável estimula ainda mais a ingestão alimentar, além do que a dieta CAF fornece uma quantidade adicional de açúcar, contribuindo para aumentar o apetite (OLIVA et al., 2017).

Figura 2: Ingestão alimentar dos grupos alimentados com dieta padrão ou ultraprocessada durante 14 semanas. Valores apresentados como média \pm desvio padrão; n=8 para cada grupo. Two-Way ANOVA com post test Bonferroni foram utilizados para a análise estatística



Apesar do aumento da adiposidade, não foi observada resistência à insulina, medida pelo teste de tolerância à insulina após os camundongos passarem por 14 semanas de dieta (**Figura 3**). Esse resultado foi inesperado, uma vez que o aumento da adiposidade é associado à indução de resistência à insulina. No entanto, pode ser que o teste de tolerância à insulina não tenha sido sensível/específico suficientemente para determinar a resistência ou então teríamos que deixá-los mais tempo em dieta CAF. Em um estudo anterior, Prada et al. (2005) demonstraram que essa mesma dieta cafeteria foi capaz de induzir resistência a insulina após 10 dias em ratos Wistar. Entretanto, o estudo além de utilizar animais diferentes do nosso estudo, realizou o teste do clamp euglicêmico hiperinsulinêmico considerado o padrão ouro para a determinação da sensibilidade à insulina (DEFRONZO, TOBIN, ANDRES, 1979), teste este que não foi empregado no presente estudo devido a sua complexidade.

Figura 3 Teste de tolerância a insulina (ITT) dos grupos alimentados com dieta padrão ou ultraprocessada durante 14 semanas. Realizado após jejum de 6h durante o período claro. O ITT foi feito com a administração da dose de 1UI/kg de insulina via IP com posterior determinação da glicemia nos tempos descritos no gráfico. Valores apresentados como média \pm desvio padrão; n=8 para cada grupo. Two-Way ANOVA com post test Bonferroni foi utilizado para a análise estatística.



Após as 14 semanas do recebimento de ambas as dietas (altamente palatável ou padrão), realizou-se o teste de tolerância à glicose (GTT) que demonstrou uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos, sugerindo intolerância à glicose

no grupo com dieta altamente palatável (**Figura 4A**). Em adição, a análise estatística observou um aumento significativo ($p < 0,05$) da glicemia de jejum no grupo com dieta com dieta altamente palatável comparado ao grupo com dieta padrão (**Figura 4B**). Em conjunto, essas alterações na glicemia basal e no GTT sugerem que 14 semanas de alimentação altamente palatável é capaz de gerar uma condição pré-diabética (STORLIEN, 1988). O aumento da adiposidade encontrada nos animais com dieta cafeteria pode ser um dos elementos explicativos da condição de pré-diabetes encontrada.

Figura 4: Teste de tolerância a glicose (GTT) (A) e glicemia de jejum (B) dos grupos alimentados com a dieta ultraprocessada ou com dieta padrão para camundongos por 14 semanas. N=6-8 por grupo. Dados apresentados como média e desvio padrão. Análise estatística teste t de student (two-tailed) (B) ou two way ANOVA (A). * $p < 0,05$ vs. dieta padrão para camundongos.

Fig. 4A

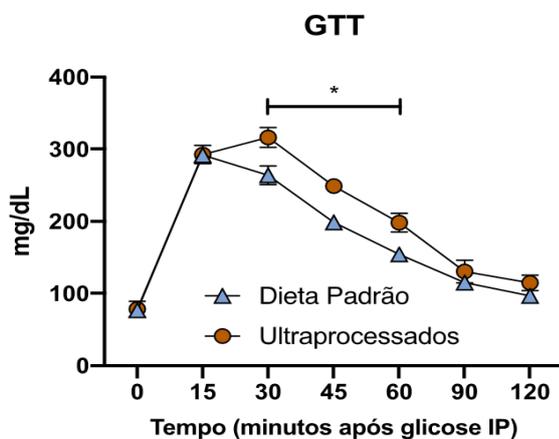
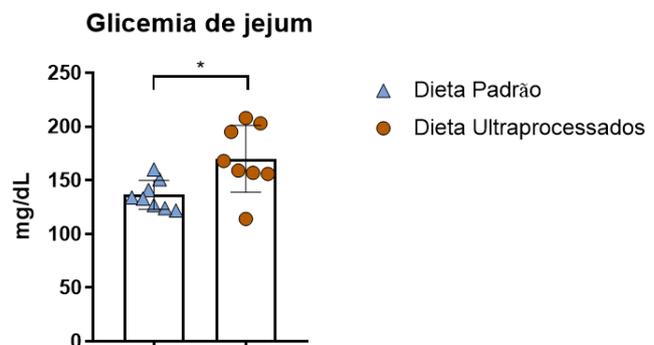


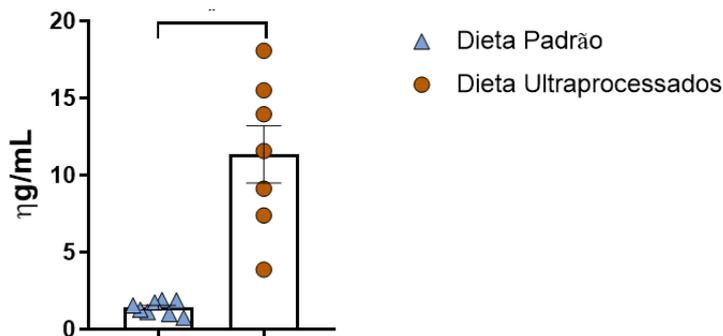
Fig. 4B



Observou-se um aumento significativo ($p < 0,5$) da leptina no grupo alimentado com ultraprocessados em comparação com o seu controle (**Figura 5**), acompanhando um aumento da massa adiposa mostrado na Figura 1B. Como a leptina é produzida pelo tecido adiposo branco e os animais que receberam dieta CAF apresentaram maior adiposidade, era esperado encontrarmos maiores níveis de leptina nesse grupo de animais (PAN; MYERS, 2018). É importante ressaltar que mesmo estando a leptina em concentrações mais elevadas, esses animais alimentados com CAF devem apresentar uma resistência as ações anorexígenas ao hormônio (PAN; MYERS, 2018),

pois detectamos hiperfagia e não hipofagia. Entretanto, essa questão pode ser mais explorada no futuro.

Figura 5: Determinação da leptina dos grupos alimentados com dieta padrão ou ultraprocessada durante 14 semanas. Valores apresentados como média \pm desvio padrão; n=8 para cada grupo. Teste t de student foi utilizado para a análise estatística.

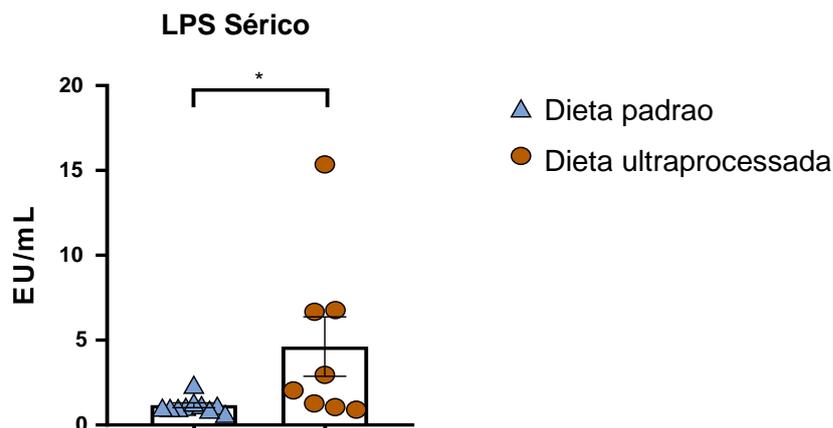


Realizamos a análise do LPS sérico como uma medida indireta de permeabilidade intestinal, uma vez que não é produzido pelo nosso organismo e compõe a parede de bactérias gram-negativas. Dessa forma, sua medida sérica sugere indiretamente um aumento da permeabilidade intestinal. De fato, observamos um aumento significativo ($p < 0,05$) do LPS sérico no grupo que recebeu a dieta altamente palatável em comparação com o grupo com dieta padrão (**Figura 6**). Este resultado pode ser devido ao excesso de gordura na dieta altamente palatável que favorece o aumento da permeabilidade da mucosa intestinal aos lipopolissacarídeos (LPS) da parede das bactérias gram-negativas que compõe a microbiota intestinal (SAAD; SANTOS; PRADA, 2016).

A via celular do LPS/TLR4 atua no desencadeamento da inflamação, porém apresenta uma interface com a resistência à insulina em indivíduos obesos (SAAD; SANTOS; PRADA, 2016). Embora não tenhamos detectado resistência à insulina nos animais alimentados com dieta cafeteria por apresentarmos algumas limitações como método utilizado (ITT) e tempo de dieta, é descrita uma elevação dos níveis de LPS em obesos (CANI et al., 2008; FRAZIER; DIBASE; MCCLAIN, 2011). O aumento do LPS em indivíduos obesos está mais relacionado ao aumento da permeabilidade intestinal do que ao número ou porcentagem de bactérias gram-negativas existentes no intestino (MANCO; PUTIGNANI; BOTTAZZO, 2010; FRAZIER; DIBASE;

MCCLAIN, 2011). No caso do presente estudo, não medimos diretamente a permeabilidade intestinal, entretanto, a dieta rica em gordura tem sido associada com a redução da expressão de proteínas que compõe as *tight junctions* entre as células epiteliais intestinais (MANCO; PUTIGNANI; BOTTAZZO, 2010; FRAZIER; DIBASE; MCCLAIN, 2011). Essas proteínas como ZO-1, claudina e ocludina criam uma barreira na mucosa intestinal impedindo que produtos bacterianos como LPS e as próprias bactérias sejam absorvidos e alcancem a circulação sanguínea (MANCO; PUTIGNANI; BOTTAZZO, 2010; FRAZIER; DIBASE; MCCLAIN, 2011). Como observamos aumento de LPS nos animais em dieta cafeteria, podemos fazer a hipótese que a gordura excessiva da dieta tenha contribuído em algum grau com a alteração da permeabilidade da mucosa intestinal, permitindo que o LPS chegasse à circulação desses animais. Entretanto, ressaltamos que mais estudos devem ser feitos nessa área para comprovar essa hipótese.

Figura 6: Análise do LPS circulante realizado no soro dos grupos alimentados com a dieta rica em gordura, ultraprocessada ou com dieta padrão para camundongos por 14 semanas. N=8-10 por grupo. Dados apresentados como média e desvio padrão. Análise estatística teste t de student (two-tailed). *p<0,05 vs. dieta padrão para camundongos.



Contudo, o aumento de LPS também poderia ser decorrente de um aumento de bactérias gram-negativas no intestino. Para entender, se esse era o caso dos animais em dieta cafeteria, prosseguimos para a próxima análise na tentativa de identificar diferenças nas espécies de bactérias entre os dois grupos de

camundongos. Realizou-se a análise metagenômica da microbiota intestinal dos dois grupos de animais após eutanásia (**Figura 7**).

Na análise metagenômica da microbiota intestinal observou-se que as espécies *Bacteroides dorei* (**A**) e *bacteroides vulgatus* (**B**) se encontraram aumentadas e a espécie *Lactobacillus johnsonii* (**C**) estava reduzida significativamente ($p < 0,05$) nos animais em dieta cafeteria em comparação com o grupo em dieta padrão, estes resultados eram esperados já que as espécies *Bacteroides dorei* e *B. vulgatus* são associadas com inflamação (ABDELLATIF et al., 2019; HIGUCHI et al., 2018) e a espécie *Lactobacillus johnsonii* geralmente associada com uma dieta equilibrada (WANG et al., 2017). Porém também encontramos resultados inesperados na composição da microbiota intestinal dos animais alimentados com a dieta cafeteria como um aumento significativo ($p < 0,05$) nas espécies *Bacteroides xylanisolvens* (**D**) que em geral está associada com uma microbiota saudável e equilibrada (DESPRES et al., 2016) e uma redução significativa ($p < 0,05$) de espécies associadas à inflamação como *Lactobacillus taiwanensis* (**E**), *Lactobacillus reuteri* (**F**) e *Blautia hydrogenotrophica* (**G**) (LI et al., 2019; MILLION et al., 2012; RAMLI et al., 2020; ZENG et al., 2013). Embora no nível de espécie isoladamente tenhamos encontrado resultados inesperados (MAZLOOM; SIDDIQI; COVASA, 2019; YANG et al., 2020) na quantificação das bactérias, os animais em dieta cafeteria apresentaram um aumento significativo das bactérias gram-negativas como *B. dorei*, *B. vulgatus* e *B. xylanisolvens* e uma redução significativa das bactérias gram-positivas como *L. taiwanensis*, *L. reuteri*, *L. johnsonii* e *Blautia hydrogenotrophica*. Em conjunto, esse aumento de bactérias gram-negativas é compatível com o aumento de LPS sérico observado nos animais em dieta cafeteria. Nesse sentido, pode-se fazer uma conjectura que apesar de individualmente cada bactéria ter um papel isolado no metabolismo, o conjunto aumentado de espécies de bactérias gram-negativas apresentado no presente estudo pode ser compatível com os dados de LPS sérico e de aumento de massa adiposa dos animais em dieta cafeteria. Não podemos descartar a possibilidade da alteração de outras espécies de bactérias ou de vírus e fungos que também habitam nosso intestino (BIBBÒ et al., 2016). Assim, a

investigação de outros microorganismos no intestino dos animais em dieta CAF seria interessante para complementar o presente estudo.

Figura 7: Análise metagenômica da microbiota intestinal dos grupos alimentados com dieta padrão ou ultraprocessada durante 14 semanas. (A) *Bacteroides dorei*, (B) *Bacteroides vulgatus*, (C) *Lactobacillus johnsonii* (D) *Bacteroides xylanisolvens*, (E) *Lactobacillus taiwanensis*, (F) *Lactobacillus reuteri* e (G) *Blautia hydrogenotrophica*. Valores apresentados

Fig. 7A

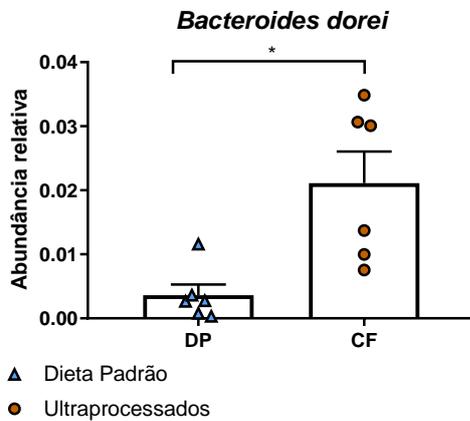


Fig. 7B

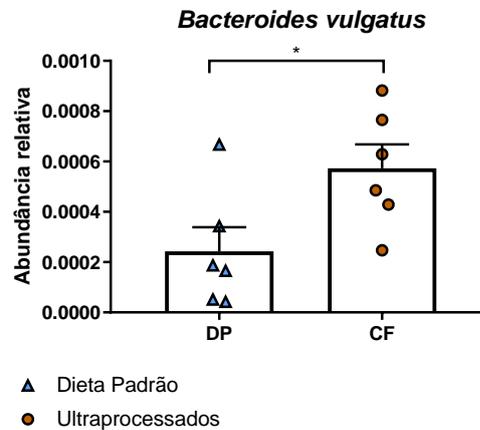


Fig. 7C

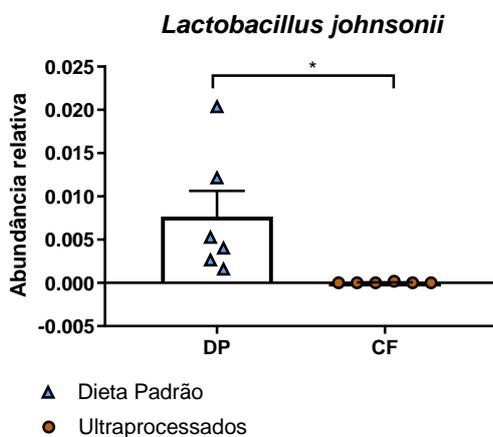


Fig. 7D

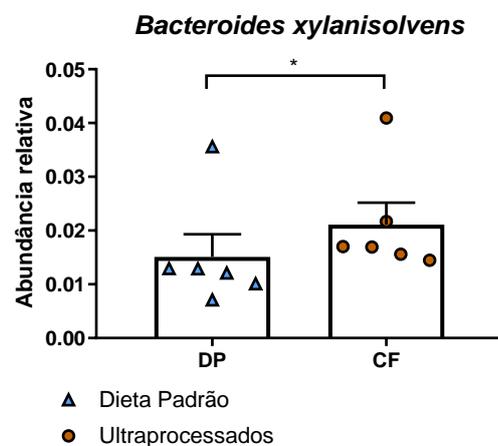


Fig. 7E

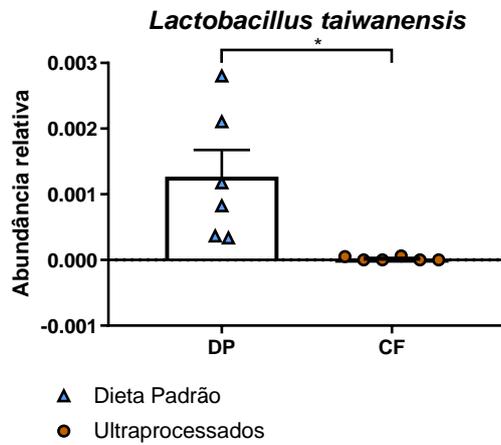


Fig. 7F

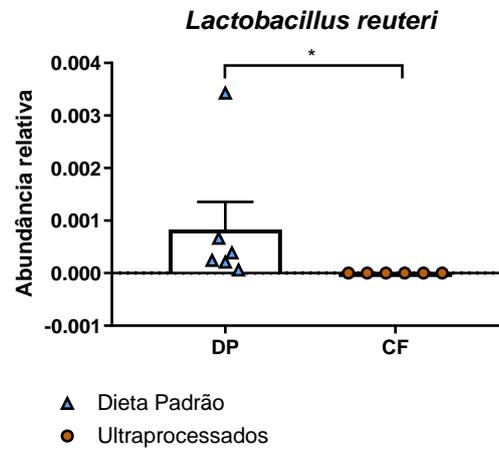
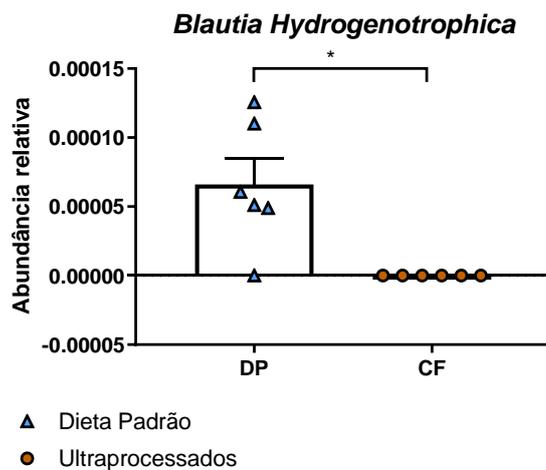


Fig. 7G



5. CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados apresentados no presente estudo sugerem que a dieta cafeteria utilizada por 14 semanas por camundongos C57BL/6J leva a hiperfagia e pode estar associada com o aumento da adiposidade e a intolerância à glicose desses animais. O maior nível sérico de leptina dos animais em dieta CAF reforça o aumento da adiposidade e sugere que esses animais devem apresentar resistência hipotalâmica à leptina (ainda não testado). O aumento dos níveis de LPS sérico assim como a composição da microbiota intestinal rica em bactérias gram-negativas podem

atuar como mecanismos ligados a gênese da obesidade e pré-diabetes do grupo que recebeu a dieta cafeteria.

É importante ressaltar a necessidade de estudos adicionais na área para assim melhorar o entendimento sobre como uma dieta rica em gordura, açúcares refinados e alimentos ultraprocessados pode levar obesidade e pré-diabetes a longo prazo.

6. REFERÊNCIAS

- ABDELLATIF, A. M. et al. Human Islet Response to Selected Type 1 Diabetes-Associated Bacteria: A Transcriptome-Based Study. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 8 nov. 2019.
- BAGAROLLI, R. A. et al. Probiotics modulate gut microbiota and improve insulin sensitivity in DIO mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 50, p. 16–25, dez. 2017.
- BATTSON, M. L. et al. The gut microbiota as a novel regulator of cardiovascular function and disease. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 56, p. 1–15, jun. 2018.
- BIBBÒ, S. et al. The role of diet on gut microbiota composition. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 20, p. 4742–4749, 2016.
- 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. **International Journal of Obesity**, v. 42, n. 3, p. 525–534, 12 set. 2017.
- 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. 1470–1481, 27 fev. 2008.
- CHAKRAVORTY, S. et al. Author manuscript; available in PMC. **J Microbiol Methods**, v. 69, n. 2, p. 330–339, 2008.
- DEFRONZO, R. A.; TOBIN, J. D.; ANDRES, R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 237, n. 3, p. E214, 1 set. 1979.
- DESPRES, J. et al. Xylan degradation by the human gut *Bacteroides xylanisolvens* XB1AT involves two distinct gene clusters that are linked at the transcriptional level. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, 4 maio 2016.
- FLEISSNER, C. K. et al. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. 6, p. 919–929, 5 maio 2010.

- FRAZIER, T. H.; DIBASE, J. K.; MCCLAIN, C. J. Gut Microbiota, Intestinal Permeability, Obesity-Induced Inflammation, and Liver Injury. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 35, n. 5_suppl, p. 14S-20S, ago. 2011.
- HIGUCHI, B. S. et al. Intestinal Dysbiosis in Autoimmune Diabetes Is Correlated With Poor Glycemic Control and Increased Interleukin-6: A Pilot Study. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 25 jul. 2018.
- LI, Q. et al. Mulberry Leaf Polyphenols and Fiber Induce Synergistic Antiobesity and Display a Modulation Effect on Gut Microbiota and Metabolites. **Nutrients**, v. 11, n. 5, p. 1017, 6 maio 2019.
- MANCO, M.; PUTIGNANI, L.; BOTTAZZO, G. F. Gut Microbiota, Lipopolysaccharides, and Innate Immunity in the Pathogenesis of Obesity and Cardiovascular Risk. **Endocrine Reviews**, v. 31, n. 6, p. 817–844, 1 dez. 2010.
- MARTIRE, S. I. et al. Altered Feeding Patterns in Rats Exposed to a Palatable Cafeteria Diet: Increased Snacking and Its Implications for Development of Obesity. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e60407, 2 abr. 2013.
- MAZLOOM, K.; SIDDIQI, I.; COVASA, M. Probiotics: How Effective Are They in the Fight against Obesity? **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 258, 24 jan. 2019.
- MELO, E. M. **Doenças Desencadeadas ou Agravadas pela Obesidade Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica - ABESO**. [s.l: s.n.].
- MILLION, M. et al. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 6, p. 817–825, 9 ago. 2011.
- MYLES, I. A. Fast food fever: reviewing the impacts of the Western diet on immunity. **Nutrition Journal**, v. 13, n. 1, 17 jun. 2014.
- NAPOLITANO, M.; COVASA, M. Microbiota Transplant in the Treatment of Obesity and Diabetes: Current and Future Perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 12 nov. 2020.
- NILSSON, C. et al. Laboratory animals as surrogate models of human obesity. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, n. 2, p. 173–181, fev. 2012.
- OLIVA, L. et al. Distributed under Creative Commons CC-BY 4.0 OPEN ACCESS. **PeerJ**, v. 5, 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Obesity. 2019.

PAN, W. W.; MYERS, M. G. Leptin and the maintenance of elevated body weight. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 95–105, 11 jan. 2018.

PATTERSON, E. et al. Gut microbiota, obesity and diabetes. **Postgraduate Medical Journal**, v. 92, n. 1087, p. 286–300, 24 fev. 2016.

PRADA, P. O. et al. Western Diet Modulates Insulin Signaling, c-Jun N-Terminal Kinase Activity, and Insulin Receptor Substrate-1ser307 Phosphorylation in a Tissue-Specific Fashion. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1576–1587, 1 mar. 2005.

RAMLI, N. S. et al. Eggshell membrane powder lowers plasma triglyceride and liver total cholesterol by modulating gut microbiota and accelerating lipid metabolism in high-fat diet-fed mice. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 5, p. 2512–2523, 5 abr. 2020.

REQUENA, T.; MARTÍNEZ-CUESTA, M. C.; PELÁEZ, C. Diet and microbiota linked in health and disease. **Food & Function**, v. 9, n. 2, p. 688–704, 2018.

ROGERO, M.; CALDER, P. Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. **Nutrients**, v. 10, n. 4, p. 432, 30 mar. 2018.

SAAD, M. J. A.; SANTOS, A.; PRADA, P. O. Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. **Physiology**, v. 31, n. 4, p. 283–293, jul. 2016.

SAMPEY, B. P. et al. Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet. **Obesity**, v. 19, n. 6, p. 1109–1117, jun. 2011.

SCHNORR, S. L. et al. Insights into human evolution from ancient and contemporary microbiome studies. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 41, p. 14–26, dez. 2016.

STORLIEN, L. H. et al. Effects of sucrose vs starch diets on in vivo insulin action, thermogenesis, and obesity in rats. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 47, n. 3, p. 420–427, 1 mar. 1988.

THURSBY, E.; JUGE, N. Introduction to the human gut microbiota. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 11, p. 1823–1836, 16 maio 2017.

VIGITEL BRASIL 2019. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico.

WANG, H. et al. Live Probiotic *Lactobacillus johnsonii* BS15 Promotes Growth Performance and Lowers Fat Deposition by Improving Lipid Metabolism, Intestinal Development, and Gut Microflora in Broilers. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 12 jun. 2017.

WU, G. D. et al. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. **Science**, v. 334, n. 6052, p. 105–108, 1 set. 2011.

ZEENI, N. et al. A cafeteria diet modifies the response to chronic variable stress in rats. **Stress**, v. 16, n. 2, p. 211–219, 10 ago. 2012.

ZENG, H. et al. Fatty Liver Accompanies an Increase in *Lactobacillus* Species in the Hind Gut of C57BL/6 Mice Fed a High-Fat Diet. **The Journal of Nutrition**, v. 143, n. 5, p. 627–631, 13 mar. 2013.