

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Tese de Doutorado

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

Rafael Calixto Bortolin

Porto Alegre

2018

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

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

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Rafael Calixto Bortolin

Orientador: Prof. José Cláudio Fonseca Moreira

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Calixto Bortolin, Rafael

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 / Rafael Calixto Bortolin. -- 2018.

178 f.

Orientador: José Cláudio Fonseca Moreira.

Tese (Doutorado) -- 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. Obesidade. 2. Dietas. 3. Guaraná. I. Fonseca Moreira, José Cláudio, orient. II. Título.

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

“Enquanto não enxergarmos a obesidade como múltiplas desordens
de origens diferentes que compartilham um fenótipo parecido,
não seremos capazes de tratá-la efetivamente”

Rafael Calixto Bortolin

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rogério e Marta, por terem me ensinado valores que levarei comigo a vida toda, por terem se doado para que nunca faltasse nada para mim e pelo amor e carinho que recebi diariamente.

Ao meu irmão, Eduardo, pelos ensinamentos, que talvez ele nem saiba que tenha me passado.

Ao meu Orientador, José Cláudio, por ter sido o meu maior mentor na vida acadêmica, por ser um exemplo de pesquisador e professor, por ser aberto a novas ideias, pela confiança e amizade que vem crescendo ao longo dos anos.

À minha namorada, Carolina, por preencher minha vida com amor, por me trazer paz e luz em momentos complicados do doutorado, por conduzir meu olhar para além da tese, por ser leve, divertida e carinhosa.

Aos colegas do laboratório 32 (Departamento de Bioquímica – UFRGS) pelo companheirismo, risadas e ensinamentos. Em especial, à Amanda por ter sido dedicado e contribuído enormemente com os trabalhos realizados durante o meu doutorado.

Ao professor Daniel por ser um exemplo de pesquisador e por ser atento as necessidades do laboratório.

À dois amigos colegas e colegas de laboratório, Juciano e Vitor, que acompanharam minha trajetória mais de perto desde o mestrado e que, com atitudes e palavras no dia a dia, me fizeram ver o mundo de uma forma diferente. Aprendi e amadureci muito com vocês.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica-UFRGS por proporcionarem condições necessárias para o desenvolvimento da minha pesquisa. Em especial à Cléia, Cláudia, Giordano, Douglas e Sérgio pela disponibilidade e inúmeras ajudas.

Aos meus amigos pelas risadas, conselhos e companheirismo, pelos momentos inesquecíveis e por serem meu refúgio do trabalho. Carrego, em mim, um pouco de cada um.

Muito obrigado!

Sumário

APRESENTAÇÃO	1
PARTE I	2
RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
LISTA DE FIGURAS	5
1. INTRODUÇÃO	6
1.1. Obesidade	6
1.2. DIETA	9
1.3. MICROBIOTA	12
1.4. SUPLEMENTOS VEGETAIS ANTI-OBESIDADE: GUARANÁ	15
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos	20
PARTE II – Resultados	21
Capítulo I	21
Capítulo II	64
Capítulo III	96
PARTE III	140
4. DISCUSSÃO	140
4.1. Reprodutibilidade e escolha adequada da dieta controle: capítulo I	141
4.2. Importância da patente e potencial comercial da dieta: Capítulo II	148
4.3. Segurança da utilização do guaraná em pó: Capítulo III	150
5. CONCLUSÃO	153
5.1. Conclusão geral	153
5.2. Conclusões específicas	153
6. PERSPECTIVAS	154
7. REFERÊNCIAS	155
8. ANEXOS	167
8.1 Cópia da carta de aprovação da comissão de ética no uso de animais (CEUA) para o desenvolvimento dos experimentos <i>in vivo</i>.	167
8.2 Outros artigos publicados durante o período do doutorado como autor ou coautor	168

APRESENTAÇÃO

A presente tese de doutorado está organizada em três partes, conforme a seguir:

Parte I: Resumo, Resumo em inglês (*abstract*), Lista de abreviaturas, Lista de figuras, Introdução e Objetivos;

Parte II: Resultados apresentados na forma de 2 artigos científicos, dentre os quais um aceito para publicação e outro submetido, e um depósito de pedido de patente. A parte II está separada em Capítulo I (artigo aceito), Capítulo II (pedido de patente) e Capítulo III (artigo submetido).

Parte III: Discussão, Conclusões, Perspectivas, Referências bibliográficas e Anexos.

PARTE I

RESUMO

A prevalência da obesidade tem aumentado drasticamente ao longo dos últimos 30 anos devido a múltiplos fatores. Além disso a obesidade tem sido considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de diversas doenças, tornando-se um grande problema de saúde pública em todo o mundo. Há na literatura diversos tipos de dietas que induzem a obesidade, as quais são muito utilizadas para se estudar os efeitos desta desordem. A mais utilizada é a dieta hiperlipídica (do inglês high-fat diet – HFD), mas uma das mais eficientes é a chamada dieta de cafeteria (CAF), a qual é composta por alimentos altamente palatáveis, como bolachas recheadas, bolos, biscoitos salgados, queijo e carnes processadas. Estes alimentos contêm uma quantidade substancial de sal, açúcar e gordura e tem como objetivo simular a dieta ocidental humana. Porém, os componentes nutricionais e não nutricionais destes alimentos variam dependendo da região onde são adquiridos e, além disso, um animal pode escolher uma seleção diferente de alimentos do que outro, o que poderia levar animais do mesmo grupo a apresentar diferentes características patológicas. Por esse motivo, esta dieta não consegue ser replicada com precisão tornando-a muitas vezes uma má escolha para a pesquisa científica. Portanto, nós decidimos projetar uma dieta com alto teor de gordura, alto teor de açúcar, alto teor de sal e baixa teor de fibras, ou seja, mais semelhante à dieta ocidental humana, mas nutricionalmente adequada, sem aditivos e sem heterogeneidade alimentar (mistura única), a fim de reunir o melhor de ambos (HFD e CAF), tornando esta dieta mais adequada e reprodutível. Assim a proposta deste trabalho foi comparar esta dieta, nomeada de dieta ocidental, com outras duas dietas obesogênicas tradicionalmente utilizadas (HFD e CAF) em relação a eficiência na indução de obesidade e suas disfunções, bem como analisar a alteração da microbiota provocada pelas mesmas. Além disso, nós pretendemos testar se o guaraná, o qual tem sido apontado como termogênico, é capaz de impedir as disfunções induzidas pela dieta ocidental proposta por nós. Nesta tese nós mostramos que a dieta ocidental foi mais eficiente em induzir a obesidade e disfunções associadas a ela do que a HFD e a CAF. Este achado nos levou a redação de uma patente reivindicando a composição e uso desta dieta por empresas. Mostramos também que a obesidade é independente de uma severa disbiose e, portanto, devemos investigar os efeitos da obesidade sobre a microbiota a níveis mais específicos tais como gênero e espécie. Por fim demonstramos o potencial antiobesidade do guaraná e um possível mecanismo envolvido através da ativação do tecido adiposo marrom. Em conjunto, estes dois trabalhos trazem novas perspectivas para quem trabalha com obesidade, principalmente no contexto de padronização de modelos e possibilidade de novas terapias.

Palavras-chave: modelo de obesidade induzido por dieta, dieta ocidental, microbiota intestinal, mecanismos antiobesidade, *Paullinia cupana*, tecido adiposo marrom.

ABSTRACT

Obesity prevalence has increased dramatically over the past 30 years due to multiple factors. In addition, obesity has been considered a major risk factor for the development of several diseases, making it a worldwide major public health problem. There are in the literature several types of diets that induce obesity, which are widely used to study the effects of this disorder. The most widely used is the high-fat diet (HFD), but one of the most efficient is the so-called cafeteria diet (CAF), which consists of highly palatable foods such as stuffed biscuits, cakes, crackers, cheese and processed meats. These foods contain a substantial amount of salt, sugar and fat and aim to simulate the human Western diet. However, the nutritional and non-nutritional components of these foods vary depending on the region where they are purchased and, in addition, the animal may choose a different selection of foods each day that could lead to different animal characteristics of the same group. However, the nutritional and non-nutritional components of these foods vary depending on the region where they are purchased and, in addition, one animal may choose a different food selection than another, which could lead to different pathological characteristics to animals of same group. For this reason, this diet can not be replicated accurately making it often a poor choice for scientific research. Therefore, we decided to design a high-fat, high-sugar, high-salt, low-fiber diet, *i.e.*, more similar to the western human diet, but nutritionally adequate, without additives and without food heterogeneity (unique mixture) in order to bring together the best of both (HFD and CAF), making this diet more suitable and reproducible. Thus, the proposal of this work was to compare this diet, termed Western diet, with two other traditionally used obesogenic diets (HFD and CAF) in relation to the efficiency in inducing obesity and its dysfunctions, as well as to analyse the microbiota alteration caused by them. In addition, we intend to test whether guarana, which has been designated as thermogenic, is able to prevent the dysfunctions induced by the Western diet proposed by us. In this thesis, we have shown that the Western diet was more efficient in inducing obesity and dysfunctions associated with it compared to the HFD and CAF. This finding led to the writing of a patent claiming the composition and use of this diet by companies. We also show that obesity is independent of severe dysbiosis and therefore we should investigate the effects of obesity on the microbiota at more specific levels such as gender and species. Finally, we demonstrate the potential anti-obesity of guarana and a possible mechanism involved through the activation of brown adipose tissue. Together, these two studies bring new perspectives to those who work with obesity, especially in the context of standardization of models and the possibility of new therapies.

Keywords: diet-induced obesity model, western diet, gut microbiota, anti-obesity mechanisms, *Paullinia cupana*, brown adipose tissue.

LISTA DE ABREVIATURAS

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa (*Tumor necrosis factor alpha*)

IL-6 – Interleucina 6 (*Interleukin 6*)

HDL – Lipoproteína de alta densidade (*High density lipoprotein*)

HFD – Dieta rica em gordura (*High-fat diet*)

rHFD – Dieta rica em gordura refinada (*Refined high-fat diet*)

LFD – Dieta pobre em gordura (*Low-fat diet*)

rLFD – Dieta pobre em gordura refinada (*Refined low-fat diet*)

CAF – Dieta de cafeteria (*Cafeteria diet*)

WD – Dieta ocidental (*Western diet*)

AMPK – Proteína cinase ativada por AMP (*AMP-activated protein kinase*)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Diagrama mostrado como a dieta pode interferir na microbiota intestinal e como a disbiose proveniente de uma dieta alterada pode levar a desordens como a obesidade.13
- Figura 2:** Foto mostrando o fruto do guaraná.18
- Figura 3:** A esquerda uma *ração padrão baseada em grãos* e a direita um dieta purificada que pode ser tanto uma *low-fat diet* (dieta pobre em gordura) quanto uma *high-fat diet* (dieta rica em gordura).144
- Figura 4:** Imagem mostrando a diferença morfológica do ceco e do cólon de animais que comeram uma ração padrão baseada em grãos (esquerda), uma *rLFD* (meio) e uma *rHFD* (direita).146

1. INTRODUÇÃO

1.1. Obesidade

1.1.1. Definição e prevalência

A obesidade é definida por um índice de massa corporal acima de 30 kg/m² e pode ser desencadeada por diversos fatores como, por exemplo, uso de medicamentos, distúrbios endócrinos, falta de sono, transtornos psiquiátricos, herança epigenética, predisposição genética (Davis et al., 2018; Duranti et al., 2017; Gérard, 2016; Valk et al., 2017). Porém, dentre eles o mais citado é o desbalanço entre o consumo e o gasto de calorias em favorecimento do primeiro (Haslam and James, 2005). Recentemente a *American Association of Clinical Endocrinologists* e a *American Medical Association* declararam oficialmente que a obesidade é uma doença e requer tratamento, mas ainda não há um consenso e a maioria dos pesquisadores ainda considera a obesidade como uma desordem metabólica (Bosello et al., 2016).

Segundo a Organização Mundial da Saúde a obesidade vem aumentando rapidamente em proporções epidêmicas em todo o mundo, principalmente devido a um estilo de vida sedentário, aumento no consumo alimentar e aumento no consumo de alimentos altamente calóricos. Resultados da *National Health and Nutrition Examination Survey* realizados entre 2013-2014 e do *Centers for Disease Control and Prevention* realizados em 2014 indicam que nos EUA ~70% dos adultos estão com sobrepeso (índice de massa corporal acima de 25 kg/m²) ou são obesos (Maffetone and Laursen, 2017; NCHS, 2016). Segundo dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) o número de pessoas com excesso de peso (sobrepeso ou obesas) vem aumentando na população brasileira. As pesquisas mostraram que para o período entre 2002 e 2003 aproximadamente 40 % da população estava com excesso de peso enquanto que para o período entre 2008 e 2009 pessoas com excesso de peso representavam aproximadamente 49 % da população (IBGE, 2009 e 2003).

Dados preocupantes vem de estudos bem recentes que mostram que mais de 90% dos adultos dos EUA, Nova Zelândia, Grécia e Islândia são *overfat*, um novo termo que se refere a um acúmulo excessivo de gordura corporal que se torna suficiente para prejudicar a saúde (Maffetone et al., 2017). Essa taxa extremamente alta é explicada pelo fato de pessoas com peso normal, mas que tenham uma proporção de gordura suficiente para prejudicar a saúde entram na conta, mostrando que o problema de excesso de gordura é bem maior do que se imagina.

1.1.2. Características fisiológicas da obesidade

O aumento excessivo do tecido adiposo (hipertrofia e hiperplasia) é a principal característica da obesidade. Antigamente, o tecido adiposo era considerado um tecido inerte servindo principalmente como estocagem de energia; porém, atualmente sabe-se que ele regula diversos processos fisiológicos e patológicos, tais como imunidade e inflamação. Hoje em dia se sabe que o tecido adiposo é uma grande fonte geradora de citocinas pró e anti-inflamatórias, conhecidas como adipocinas, tais como TNF- α , IL-6, leptina, resistina e adiponectina. Sabe-se que na obesidade há um desbalanço entre estas adipocinas levando a um favorecimento de um estado pró-inflamatório. Por esse motivo a obesidade está associada a um bem descrito quadro pró-inflamatório crônico de baixo grau, o qual pode levar a uma série de disfunções metabólicas (González-Muniesa et al., 2017; Lee et al., 2013). Já está caracterizado que este quadro pró-inflamatório crônico pode levar a um desbalanço redox conhecido como estresse oxidativo e que este também pode estar contribuindo para as disfunções metabólicas associadas à obesidade. Adicionalmente, o estresse oxidativo pode levar a danos celulares ou teciduais e disparar uma resposta inflamatória, configurando um ciclo vicioso (Bondia-Pons et al., 2012; Naderali et al., 2009). Aceita-se hoje em dia que a inflamação crônica e o estresse

oxidativo são duas importantes condições para o desenvolvimento de síndrome metabólica, bem como de muitas doenças degenerativas, como por exemplo diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e câncer, as quais tem seu aparecimento favorecido pela obesidade (Bondia-Pons et al., 2012; Chung et al., 2009; González-Muniesa et al., 2017).

A síndrome metabólica é caracterizada pela obesidade concomitante com desordens metabólicas como: hipertrigliceridemia, reduzido HDL, pressão arterial elevada, resistência à insulina e aumento dos níveis de glicose em jejum (Kennedy et al., 2010). A síndrome metabólica pode ser considerada um passo intermediário entre o estado pró-inflamatório crônico da obesidade e o aparecimento de doenças degenerativas, uma vez que após o estabelecimento da síndrome há um aumento no risco de doenças como, diabetes tipo 2, acidente vascular cerebral, doenças cardiovasculares, determinados cânceres, doença hepática gordurosa não alcoólica e doenças alérgicas (Alam et al., 2012; Monteiro and Azevedo, 2010).

1.1.3. Etiologia e tratamento da obesidade

A etiologia da obesidade é multifactorial, englobando ambiente, genética, dieta e estilo de vida, e pode ser diferente para cada indivíduo (Duranti et al., 2017). Tem se dado pouca atenção para a identificação das causas que contribuem para o ganho de peso em pacientes com obesidade. No entanto, reconhecer esses fatores é importante para levar a estratégias de tratamento mais específicas e eficazes. Além dos conhecidos aspectos relacionados ao estilo de vida, a obesidade pode ser causada ou mantida por uso de medicação, falta de sono, fatores epigenéticos, distúrbios endócrinos ou hipotalâmicos, doenças monogênicas ou sindrômicas e fatores psicológicos, os quais podem exigir tratamento médico específico (Davis et al., 2018; Duranti et al., 2017; Gérard, 2016; Valk et al., 2017).

Recentemente, a alteração na microbiota intestinal tem sido considerada um dos fatores que pode levar a obesidade (Harakeh et al., 2016; Khan et al., 2016). Devido a isso, estratégias como transplante de fezes já estão sendo usados e estão mostrando bons resultados. De certa forma, isto reforça a ideia do tratamento personalizado, uma vez que cada vez mais se comprova a etiologia multifatorial da obesidade. Atualmente, as estratégias mais usadas no combate a obesidade são alteração na dieta e aumento na atividade física (agem sobre as causas), e utilização de drogas e cirurgia (agem sobre as consequências). Precisamos começar a chamar a atenção para os outros fatores que causam a obesidade, assim novas abordagens terapêuticas poderão surgir. Além disso, é necessário começar a classificar qual tipo de obesidade se está estudando. Nesta tese iremos abordar a obesidade causada por dieta, principalmente a dieta ocidental.

1.2. DIETA

1.2.1. Mudança nos hábitos alimentares

Como já discutido, as causas da obesidade na população são múltiplas e complexas. Porém o sedentarismo e a mudança nos hábitos alimentares têm sido apontados como os dois principais fatores por trás da epidemia global de obesidade (Davis et al., 2018; Hill and Melanson, 1999). O hábito alimentar dos seres humanos vem mudando continuamente, o qual é um dos fatores mais fortes que explica a obesidade mundial. Dado que a proporção de macronutrientes na dieta parece não mudar muito ao longo dos anos (Hall, 2018), quais são essas mudanças? Algo que está mudando é o tipo de macronutriente. Se consome cada vez mais produtos processados como açúcar refinado, xarope de milho, óleos refinados (Barrett et al., 2016; Cordain et al., 2005). Outro hábito que vem aumentando é o consumo de alimentos ultraprocessados tais como bolachinhas recheadas, salgadinhos, bolos, alimentos pré-cozidos, etc., os quais são altamente

calóricos e com baixo valor nutricional. Também, tem sido demonstrado que o tamanho das porções de comida tem aumentado com o tempo e que isso está associado com o aumento no consumo de calorias ao longo dos anos e, portanto, pode estar relacionado com a epidemia global de obesidade (Benton, 2015; Kral and Rolls, 2011; Livingstone and Pourshahidi, 2014; Young and Nestle, 2002). Outros fatores como o consumo de comida de alto valor energético, frequência de ingestão, bem como menor custo e maior disponibilidade de comida também vem sendo discutidos como a causa da obesidade global (Barrett et al., 2016; Hill, 2006; Hill and Melanson, 1999; Stein and Colditz, 2004). De um modo geral, as mudanças nos hábitos alimentares são cada vez mais em direção ao aumento no consumo de caloria.

1.2.2. Modelos indutores de obesidade: dieta

Diversos modelos animais têm sido utilizados para estudar a obesidade, como por exemplo animais com alterações genéticas, fármacos indutores de obesidade e dietas indutoras de obesidade. Porém, considerando que o modelo deve ser o mais próximo possível da gênese da obesidade em humanos, a indução da obesidade via mudança nos hábitos alimentares parece ser o mais apropriado. Um dos modelos que reflete melhor a obesidade humana é o modelo de obesidade induzido por dieta (em inglês conhecido como diet-induced obesity model) (revisado por Buettner et al., (2007)). Este modelo se baseia em fornecer uma dieta hipercalórica aos animais durante um período de tempo que varia entre 1 e 6 meses, geralmente. Após este modelo animal ser proposto novas dietas foram testadas afim de buscar um modelo mais eficiente e/ou realista da obesidade humana. Atualmente, duas dietas são as mais utilizadas, sendo que uma delas é conhecida como dieta rica em gordura (do inglês *high-fat diet*), a qual apresenta uma quantidade elevada de gordura na dieta; já a outra dieta é conhecida como dieta de cafeteria (do inglês

cafeteria diet), a qual é composta por diversos alimentos palatáveis, hipercalóricos e altamente industrializados (por exemplo, queijo, salame, bolo, bolacha recheada, salgadinhos, etc.) (Buettner et al., 2007; Nilsson et al., 2012). Mais recentemente pesquisadores tem começado a fornecer uma dita rica em gordura e sacarose aos animais afim de induzir mais facilmente a obesidade nesses animais.

1.2.3. Desvantagens das dietas existentes na literatura

A composição da dieta rica em gordura não é padronizada e, portanto, pode variar de um estudo para o outro em relação a quantidade e o tipo de gordura, podendo gerar fenótipos diferentes entre animais de estudos diferentes, dessa forma dificultando a comparação entre os diferentes trabalhos (Buettner et al., 2007; Nilsson et al., 2012). Uma outra desvantagem da dieta rica em gordura é que quando comparada com outras dietas indutoras de obesidade, ela é, frequentemente, menos eficiente em induzir a obesidade (Higa et al., 2014; Sampey et al., 2011). A dieta de cafeteria, por sua vez, apresenta vantagens e desvantagens em relação a dieta rica em gordura. Uma das vantagens é que a dieta de cafeteria simula melhor a dieta ocidental humana, uma vez que apresenta alimentos altamente industrializados e energéticos que contem grandes quantidades de sal, açúcar e gordura (Nilsson et al., 2012). Além disso, como dito anteriormente a dieta de cafeteria é mais eficiente em induzir a obesidade do que a dieta rica em gordura (Higa et al., 2014; Nilsson et al., 2012; Sampey et al., 2011). Porém, a dieta de cafeteria tem sido criticada por ser menos padronizada do que a dieta rica em gordura, uma vez que cada pesquisador faz a sua própria composição de alimentos industrializados, pois estes variam de região para região; além disso, os próprios animais podem consumir alimentos diferentes entre eles (Moore, 1987; Nilsson et al., 2012). Outra desvantagem desta dieta é que os animais podem apresentar deficiências nutricionais de proteína, vitaminas e

minerais, uma vez que alimentos altamente industrializados são pobres nestes nutrientes (Moore, 1987; Nilsson et al., 2012). Por último, deve ser salientado que a dieta de cafeteria apresenta vários aditivos alimentares (corantes, flavorizantes, conservantes, emulsificantes, etc.), os quais não estão presentes na ração controle dos animais e, portanto, poderia dificultar a interpretação dos resultados (Bortolin et al., 2017).

1.3. MICROBIOTA

1.3.1. Visão geral

A microbiota intestinal é um ecossistema complexo composta por inúmeros microorganismos que residem no intestino, dentre eles bactérias, arqueias, fungos, e vírus que residem em nosso intestino, o qual é a nossa maior interface com o meio externo (200m^2) (Mosca et al., 2016; Scarpellini et al., 2015). Em humanos, o número de células desses micro-organismos é igual ou maior do que o número do próprio hospedeiro e representam entre 0,2 e 1Kg do peso do corpo de um ser humano de porte médio. Um novo conceito surgiu como resultado do grande número de células bacterianas no corpo, hospedeiro e seus microorganismos juntos tem sido chamados de "superorganismo" (Gérard, 2016; Sender et al., 2016; Thursby and Juge, 2017). Estes co-evoluíram junto com o hospedeiro e assim passaram a desempenhar diversas funções para o hospedeiro, tais como maturação do sistema imune, modulação de funções cerebrais e do metabolismo, metabolização de xenobióticos, manutenção da integridade da barreira intestinal, e absorção de nutrientes, a maioria delas de suma importância para a ótima saúde do hospedeiro (Gérard, 2016; Jandhyala et al., 2015; Scarpellini et al., 2015). Portanto, é de se imaginar que um distúrbio na microbiota intestinal pode acarretar em prejuízos à saúde do hospedeiro. Este distúrbio na microbiota intestinal é conhecido como

disbiose e pode ser ocasionado por alteração na dieta, dentre outros fatores (Figura 3) (Marchesi et al., 2016; Thursby and Juge, 2017).

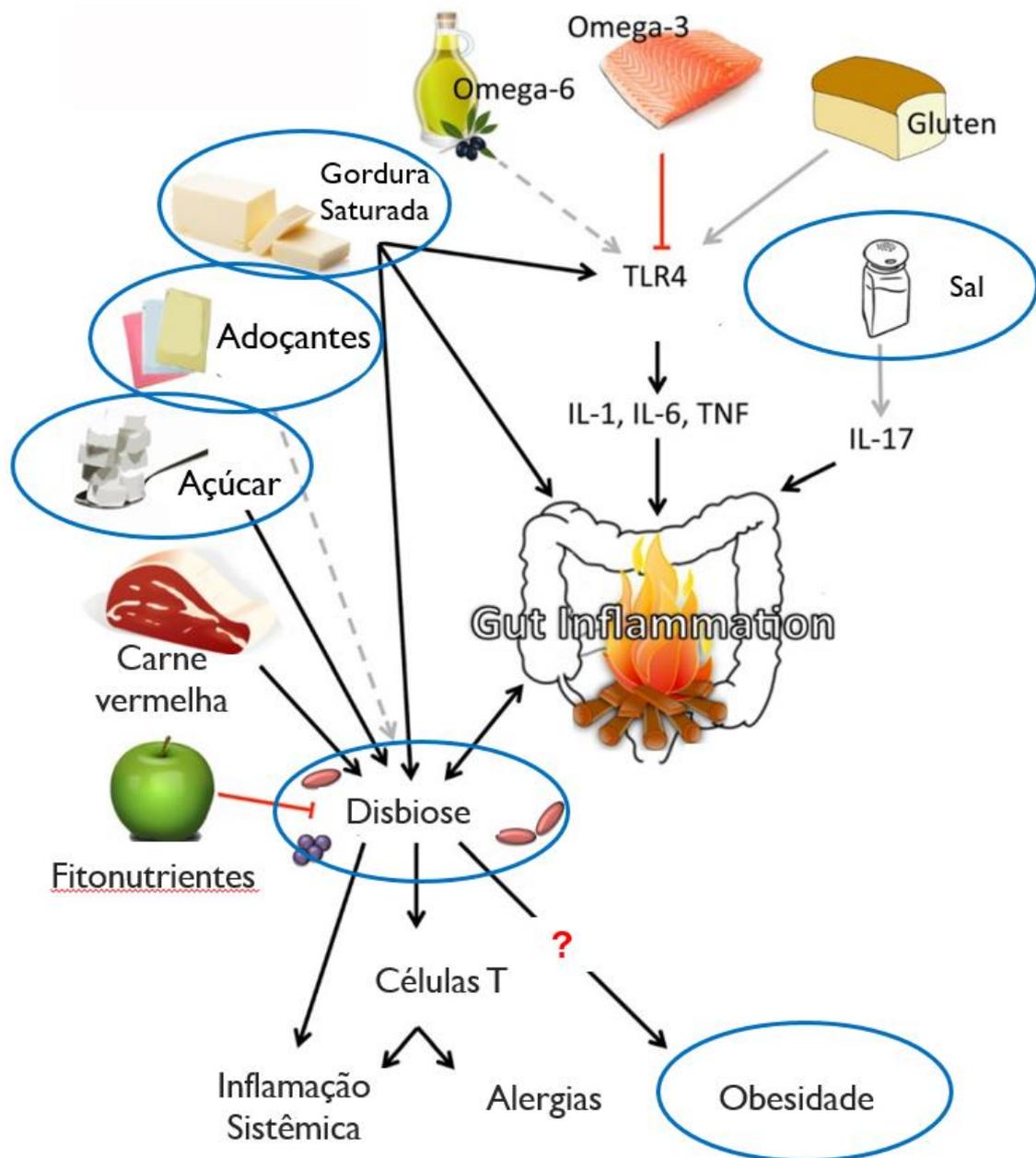


Figura 1: Diagrama mostrado como a dieta pode interferir na microbiota intestinal e como a disbiose proveniente de uma dieta alterada pode levar a desordens como a obesidade.

[Imagem reproduzida e adaptada de Myles (2014)]

A microbiota intestinal de humanos, ratos e camundongos é dominada pelos filos Firmicutes e Bacteroidetes, os quais correspondendo a mais de 80% do total (Duca and Lam, 2014; Lecomte et al., 2015; Rabot et al., 2016). Um desequilíbrio entre esses dois filos, o qual também pode ser chamado de disbiose, tem sido tradicionalmente associado a obesidade. No entanto estudos mais recentes têm mostrado que isso talvez não seja uma verdade absoluta (Rosenbaum et al., 2015). Já a disbiose, a qual pode ser avaliada em diversos níveis, tem sido conectada à diversas doenças, tais como obesidade, doença do intestino inflamado, diabetes e autismo (Figura 3) (DeGruttola et al., 2016).

1.3.2. Microbiota e obesidade

A Microbiota tem atraído muita atenção em estudos de obesidade e disfunções associadas a ela, principalmente após estudos com transplante de fezes em camundongo, onde foi observado que o transplante de fezes de indivíduos obesos para indivíduos magros era suficiente para causar obesidade nesses animais (Boulangé et al., 2016; Brown et al., 2012; Lecomte et al., 2015; Shen et al., 2013; Sonnenburg and Bäckhed, 2016; Tremaroli and Bäckhed, 2012; Wu et al., 2011). Outros estudos mostram que camundongos *germ-free* que receberam a microbiota de camundongos obesos induzidos por dieta mostraram aumento na quantidade de tecido adiposo (Clarke et al., 2014; Sonnenburg and Bäckhed, 2016; Walker and Parkhill, 2013) e que a microbiota de camundongos geneticamente obesos quando transplantada a camundongos magros induz um aumento de adiposidade (Sonnenburg and Bäckhed, 2016). Além disso, foi mostrado que a microbiota de obesos tem uma habilidade maior de retirar energia dos alimentos (Turnbaugh et al., 2006). Esses achados em conjunto suportam a ideia da microbiota alterada como causa da obesidade. Por outro lado, ainda é controverso se a obesidade é causa ou consequência microbiota alterada (Bäckhed, 2009).

Parece ser um consenso na literatura científica da área que a diversidade bacteriana é um dos principais fatores para determinar a saúde da microbiota intestinal (Sonnenburg and Bäckhed, 2016). A baixa diversidade microbiana intestinal tem sido associada a obesidade, resistência à insulina e inflamação (Le Chatelier et al., 2013; Sonnenburg and Bäckhed, 2016; Turnbaugh et al., 2008). Além disso, um estudo mostrou, por exemplo, que uma diminuição da diversidade da microbiota intestinal está associada a hábitos não saudáveis, tais como o consumo de refrigerantes, salgadinhos e alto consumo de Kcal, enquanto uma alta diversidade foi associada a hábitos saudáveis como o consumo de vegetais, frutas e chás (Zhernakova et al., 2016). Essas descobertas em conjunto sugerem que a diminuição da diversidade pode ser uma consequência de maus hábitos e da obesidade.

1.4. SUPLEMENTOS VEGETAIS ANTI-OBESIDADE: GUARANÁ

1.4.1. Histórico

Plantas vem sendo usadas com uma propósito medicinal a milênios (Martel et al., 2016). As plantas, bem como outros organismos sésseis, produzem uma variedade enorme de compostos químicos que atuam principalmente como defesa contra herbívora, radiação solar, estresse e doenças causadas por micro-organismos (Iriti and Faoro, 2009). Muitos desses fitoquímicos apresentam potenciais bioativos importantes em mamíferos quando administrados em baixas quantidades, tais como anticoagulante e anti-inflamatório (ácido salicílico), sedativo (morfina), atropina (relaxante muscular), entre vários outros (Martel et al., 2016). O uso de suplementos e fitoquímicos derivados de plantas, bem como a utilização de infusões a base de plantas, tem expandido no mundo todo. Estima-se que 80% da população mundial utilizem produtos derivados de plantas como fonte primária de cuidados à saúde (Ekor, 2014). Para ressaltar ainda mais a importância dos estudos

com produtos derivados de plantas: aproximadamente 50% de drogas farmacêuticas são derivadas direta ou indiretamente de plantas (Martel et al., 2016). Portanto o estudo de derivados de plantas parece ser um bom caminho para o desenvolvimento de novas drogas.

1.4.2. Estratégias alternativas no combate contra a obesidade

Devido ao grande problema de saúde público causado pela obesidade, existe um grande interesse em encontrar estratégias para reduzir o peso corporal. Porém, as estratégias antiobesidade atuais, as quais visam principalmente restringir o consumo energético e aumentar atividades físicas são de eficácia variável e estão longe de serem satisfatórias. Existem alguns medicamentos eficazes, mas possuem severos efeitos colaterais (Martel et al., 2016; Pittler et al., 2005; Ravussin and Galgani, 2011). Portanto, é necessária urgentemente uma estratégia alternativa efetiva para aumentar o gasto energético de maneira eficaz e segura. Bons alvos são compostos derivados de plantas, os quais muitos já tem sido mostrado atuar em diferentes mecanismos, tais como na ativação do tecido adiposo marrom, redução do apetite e diminuição da absorção de lipídios (Martel et al., 2016; Pittler et al., 2005; Ravussin and Galgani, 2011).

1.4.3. Segurança e eficácia de produtos de origem vegetal usados para emagrecer

Muitos estudos mostraram potencial anti-obesidade de várias ervas naturais, como chá verde, café verde, feno-grego e pimenta (Martel et al., 2016). Porém, o consumo de produtos derivados de plantas, na forma de extratos ou fitoquímicos isolados, com objetivo de reduzir o peso têm sido muito consumidos e geralmente sem nenhuma prescrição de um profissional da área. Estima-se que em 2001 nos EUA tenha sido gasto

cerca de US\$ 1,3 bilhões com estes produtos (Blanck et al., 2007; Martel et al., 2016). Além disso, uma grande quantidade de evidências mostrou que alguns dos suplementos de ervas utilizados para perda de peso em obesos foram associados à toxicidade (Ioannides-Demos et al., 2006; Pittler et al., 2005; Restani et al., 2016). Por exemplo, uma meta-análise, que compilou dados de pílulas para perda de peso contendo estimulantes ephedra e/ou efedrina (com ou sem cafeína), encontrou uma maior perda de peso por até 6 meses comparado com o grupo placebo, mas os usuários tiveram aproximadamente 3 vezes mais chance de apresentar efeitos adversos, incluindo problemas psíquicos, gastrointestinais e cardíacos (Shekelle et al., 2003). Porém, muitos desses produtos são rotulados como "naturais", um termo que muitas vezes é interpretado como “seguro”. Podemos ressaltar ainda que para muitos desses produtos, as reivindicações sobre sua efetividade são falsas e enganosas (Blanck et al., 2007). Portanto a eficácia e segurança de produtos derivados de plantas tem se tornado uma preocupação atual (Ekor, 2014; Martel et al., 2016). Em termos mais gerais, existem preocupações quanto à falta de controle de qualidade (variabilidade de quantidades e contaminação) e a possibilidade de efeitos colaterais, como efeitos tóxicos diretos, reações alérgicas e interações com outros suplementos ou medicamentos, especialmente para suplementos contendo estimulantes (Blanck et al., 2007).

1.4.4. Guaraná

Guaraná (*Paullinia cupana*) é uma espécie nativa da região amazônica conhecida por suas propriedades medicinais e estimulantes e utilizada há séculos pelas comunidades indígenas da Amazônia. É popularmente valorizado pela sua propriedade estimulante, principalmente, mas também como afrodisíaco e para redução de peso. O guaraná é produzido principalmente nos estados brasileiros do Amazonas e da Bahia, e

aproximadamente 70% da produção é utilizada pela indústria de refrigerantes e bebidas energéticas. Dentre os outros 30%, 10% são comercializados como pó de guaraná para consumo direto em cápsulas ou diluição em água, e os outros 20% servem como matéria-prima para as indústrias farmacêutica e cosmética (revisado por Schimpl et al. (2013)).

As sementes são a parte comercialmente utilizada da planta, principalmente devido ao seu conteúdo do alcaloide purínico conhecido como cafeína (1,3,7-tri-metilxantina), ao qual a propriedade estimulante do guaraná é atribuída. A semente de guaraná contém entre 2 e 6% de cafeína, o qual é bastante alto quanto comparado com café, chá verde e erva mate. Porém, se sabe que outros alcalo;;;;ides purínicos, também com capacidade estimulatória, como teobromina e teofilina, são encontrados nas sementes de guaraná em uma menor quantidade (0,3%) (Schimpl et al., 2013). Além disso, Catequinas e epicatequinas são presentes na semente, os quais juntos com as metilxantinas são os maiores alvos de interesse científico da semente, devido ao seu potencial de aplicação na indústria farmacêutica e cosmética (Bittencourt et al., 2014; Schimpl et al., 2013).



Figura 2: Foto mostrando o fruto do guaraná. [Imagem retirada da página: <https://www.biovontade.com/en/products/categories/vegetable-powders-and-extracts/other-plant-extracts/17-guarana>]

O guaraná comercializado para redução de peso geralmente está misturado a outras substâncias. Porém, enquanto algumas evidências sugeriram um potencial de redução de peso do guaraná (Andersen and Fogh, 2001; Boozer et al., 2001; Costa Krewer et al., 2011; Opala et al., 2006), outras evidências apontam para possíveis efeitos adversos (Baghkhanian and Jafari, 2002; Ioannides-Demos et al., 2006; Pittler et al., 2005; Restani et al., 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver um modelo de dieta indutora de obesidade mais adequado que os modelos de dietas atuais para estudar a obesidade. Utilizar o modelo de dieta mais adequado encontrado para investigar o potencial antiobesidade do guaraná (*Paullinia cupana*) – uma planta nativa do Brasil.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver uma dieta animal baseada no consumo ocidental humana e comparar esta dieta com duas dietas indutoras de obesidade clássicas (dieta hiperlipídica e de cafeteria) à nível de disfunções metabólicas associadas a obesidade e perfil da microbiota intestinal (Capítulo I).

- Redigir um pedido de patente, caso a dieta desenhada por nós seja um modelo mais robusto de dieta indutora de obesidade (Capítulo II).

- Avaliar o potencial e antiobesidade do guaraná, bem como elucidar possíveis mecanismo envolvidos. Além disso, verificar a toxicidade do guaraná e tentar encontrar uma dose segura (Capítulo III).

PARTE II – Resultados

Capítulo I

Artigo aceito

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

(DOI: 10.1038/ijo.2017.225)

Artigo aceito pela *International Journal of Obesity* em setembro de 2017

1 A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to
2 high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption

3

4 **Running title:** Western-style diet for diet-induced obesity models

5 Rafael Calixto Bortolin¹, Amanda Rodrigues Vargas¹, Juciano Gasparotto¹, Paloma Rodrigues Chaves¹,
6 Carlos Eduardo Schnorr¹, Katia da Boit Martinello³, Alexandre Kleber Silveira¹, Thallita Kelly Rabelo²,
7 Daniel Pens Gelain¹ and José Cláudio Fonseca Moreira¹

8

9 ¹Centro de Estudos em Estresse Oxidativo - Departamento de Bioquímica – Instituto de Ciências Básicas
10 da Saúde - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Ramiro Barcelos, 2600 –
11 Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

12 ²Departamento de Educação em Saúde – Campus Universitário Professor Antônio Garcia Filho –
13 Universidade Federal de Sergipe (UFS), Avenida Governador Marcelo Déda, 13 - CEP 49400-000
14 Lagarto, SE, Brasil.

15 ³Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental – Universidad de la Costa, Calle 58 #55-66, CP
16 080002, Barranquilla, Atlántico, Colombia.

17

18 **Corresponding author:**

19 Rafael Calixto Bortolin

20 e-mail: rafaelbortolin@hotmail.com

21 Phone: +55 51 33085578

22 Fax: +55 51 33085540

23

24 **Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

25

26 **Support:** Funding for this project was provided by the Brazilian funding agencies CNPq (402471/2013-
27 0), CAPES, FAPERGS (PRONEX 16/2551-0000 499-4) and PROPESQ-UFRGS.

28 **Abstract**

29 **BACKGROUND/OBJECTIVE:** Obesity is a metabolic disorder that predisposes patients to numerous
30 diseases and has become a major global public-health concern. Animal models of diet-induced obesity
31 (DIO) are frequently used to study obesity, but which DIO model most accurately reflects the pathology
32 of human obesity remains unclear. In this study, we designed a diet based on the human Western diet
33 (WD) and compared it with the cafeteria diet (CAF) and high-fat diet (HFD) in order to evaluate which
34 diet most closely mirrors human obesity.

35 **METHODS:** Wistar rats were fed four different diets (WD, CAF, HFD, and a low-fat diet) for 18 weeks.
36 Metabolic parameters and gut microbiota changes were then characterized.

37 **RESULTS:** Rats fed the four different diets exhibited completely different phenotypes, highlighting the
38 importance of diet selection. This study also revealed that WD most effectively induced obesity and
39 obesity-related disorders, and thus proved to be a robust model of human obesity. Moreover, WD-fed rats
40 developed obesity and obesity-related comorbidities independent of major alterations in gut microbiota
41 composition (dysbiosis), whereas CAF-fed rats developed the greatest dysbiosis independent of obesity.
42 We also characterized gut microbiota after feeding on these four different diets and identified five genera
43 that might be involved in the pathogenesis of obesity.

44 **CONCLUSIONS:** These data suggest that diet, and not the obese state, was the major driving force
45 behind gut microbiota changes. Moreover, the marked dysbiosis observed in CAF-fed rats might have
46 resulted from the presence of several additives present in the CAF diet, or even a lack of essential
47 vitamins and minerals. Based on our findings, we recommend the use of the prototypic WD (designed
48 here) in DIO models. Conversely, CAF could be used to investigate the effects of excessive consumption
49 of industrially-produced and highly-processed foods, which are characteristic of Western society.

50

51

52 **INTRODUCTION**

53 Obesity is a metabolic disorder defined as having a body mass index (BMI) of ≥ 30 kg/m². An elevated
54 BMI is a major risk factor for several complications, including diabetes, cardiovascular disease, cancer,
55 and gastrointestinal diseases, and thus it contributes to the overall disease burden worldwide^{1,2}. Moreover,
56 obesity prevalence has increased worldwide at an alarming rate, primarily due to reduced physical activity
57 and Westernization of dietary habits¹⁻³. For instance, in the USA, Western society's archetypal country,
58 ~70% of adults are overweight or obese according to the 2013–2014 National Health and Nutrition
59 Examination Survey⁴.

60

61 The relevance of obesity worldwide has fostered a continual search for improved models for studying
62 obesity, and, among these, one of the most frequently used is the diet-induced obesity (DIO) model⁵. In
63 the DIO models, which provide highly human-like models, numerous obesity-inducing diets are used,
64 including high-fat diets (HFDs) and cafeteria diets (CAFs)^{5,6}. In HFDs, various fat sources are used in
65 different proportions, but no consensus exists regarding which HFD is the most appropriate; thus, the
66 phenotypes observed, as well as the physiological and biochemical parameters, might vary between
67 different studies and thereby make comparisons between them challenging⁵. In turn, because CAFs are
68 composed of diverse highly palatable energy-dense foods, (e.g., cheese, cake, salami, and cookies), that
69 contain substantial amounts of salt, sugar, and fat, CAFs simulate relatively more closely the human
70 Western diet^{5,6}. Furthermore, CAFs induce obesity and related disorders more efficiently than the
71 traditional HFDs^{7,8}. However, CAFs have been criticized for being even less standardized than the
72 predefined HFDs⁶. Because each animal may choose a diet with a composition different from that chosen
73 by other animals, and because different researchers worldwide have created their own unique CAFs based
74 on regional snacks, animal phenotypes might vary within, and even between studies. Moreover, because
75 highly processed foods commonly contain less than adequate protein, mineral, and vitamin contents,
76 animals that are fed such foods might experience nutritional deficiencies⁹. Lastly, highly processed foods
77 also contain large amounts of additives (e.g., preservatives, colourings) that could cause additional
78 interference in the results.

79

80 Based on the aforementioned issues, we sought to design a prototypic Western diet (WD) to be as similar
81 as possible to the human diet (i.e. a diet with high-fat, high-sugar, and high-salt content, and a low-fiber

82 content), but which is nutritionally adequate, free of additives, and does not exhibit food heterogeneity
83 (unique mixtures). Our aim was to combine the optimal properties of HFDs and CAFs and thus generate a
84 diet that is highly suitable and reproducible.

85

86 In this study, we used three different DIO models. No previously published study has performed a
87 complete comparison between these three DIO models, encompassing evaluation of metabolic
88 dysfunction and gut microbiota. The gut microbiota data is of particular interest since there is an
89 accumulation of evidence that suggests that gut microbiota composition might be associated with the
90 development of obesity, and obesity-associated disorders¹⁰⁻¹³. To establish which diet model is the most
91 robust and reproducible for studying obesity, we compared the prototypic WD developed by us with the
92 two traditional obesogenic diets, namely HFD and CAF. We hypothesized that our prototypic WD, as
93 compared to HFD or CAF, would provide a more adequate model of human obesity, and we confirmed
94 this through appropriate metabolic characterization. We also investigated and compared alterations in gut
95 microbiota induced by these three diets, based on considering that the documentation of these alterations
96 could provide a foundation for future investigations into the induction of obesity.

97

98 **MATERIAL AND METHODS**

99 **Animals**

100 Male Wistar rats (8 weeks old) were obtained from our breeding colony. They were housed three
101 rats/cage with *ad libitum* access to water and standard commercial chow (Chow Nuvilab CR-1 type;
102 Curitiba, PR, Brazil). Rats were maintained on a 12 h light-dark cycle in a temperature-controlled colony
103 room (21°C) for two weeks before being randomly assigned to one of the four experimental diet groups
104 (acclimatization).

105

106 **Ethics Statement**

107 All animal experiments were performed at Departamento de Bioquímica of Universidade Federal do Rio
108 Grande do Sul (UFRGS) and were approved by the Ethical Committee on Animal Use (CEUA) of the
109 UFRGS (protocol number 27648). All experimental procedures were performed in accordance with the
110 Guide for Care and Use of Laboratory Animals¹⁴.

111

112 **Experimental design**

113 After the end of the acclimatization period, 10-week old rats (n = 12 per group) were then maintained, *ad*
114 *libitum*, for 18 weeks on either a high fat diet (HFD) containing 60% Kcal from fat, a cafeteria diet (CAF)
115 containing seven human snack foods (cheese, cake, salami, filled biscuit, puff biscuit, crackers, and
116 cookies), a Western diet (WD), or a control diet (a matched low-fat chow based on AIN-93¹⁵). The WD
117 was designed to produce a more realistic model diet of the human WD, with 42.5% Kcal being derived
118 from fat, and being high in simple carbohydrates and salt, and low in fiber (the nutrients in our prototypic
119 WD and the typical human WD are compared in Table 1). Consequently, the WD was very similar to the
120 cafeteria diet but in a standardized way. The WD was designed based on data reporting the current
121 average consumption of a Western society (20–29-year-old males)^{3,16,17}. The nutritional information about
122 the snacks used in the cafeteria diet are shown in Supplementary Table S1. Diets were provided in pellet
123 form (except CAF) and were changed every two days. The Kcal sources for each diet are provided in
124 Supplementary Table S2.

125

126 **Analysis**

127 The supplementary information (Supplementary Appendix-I) describes in more detail the methodologies
128 related to material collection, body weight, food intake, histology, adiposity index, lipid profile, serum
129 metabolites, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, serum cytokines and hormones levels,
130 the homeostatic model assessment of insulin resistance, N^ε-carboxymethyllysine levels, food preference
131 and choice, choline analysis, DNA extraction, and sequencing analysis. The exact sample size (n) for each
132 experimental group is shown in the Figure legends.

133

134 **Statistics**

135 Analysis was performed using ANOVA followed by Tukey post hoc test (homogeneity of variance was
136 tested using Levene's test). In the case of a non-parametric distribution of data, the Kruskal-Wallis test
137 was used. Chi-square tests were used to compare associations of categorical variables with diagnosis of
138 hepatic steatosis. For food preference analysis, an ANOVA was used controlling the day effect.
139 Evaluation of the relationship between the different variables was carried out using Pearson's correlation
140 at the $p < 0.05$ confidence level. Differences in microbial communities were assessed using ANOVA
141 followed by a Tukey-Kramer post hoc test; when only two groups needed to be compared a two-sided
142 Student's t-test was used. No blinding was carried out for data analysis. Samples were excluded when
143 they were outliers. Data are shown as means \pm SEM. Significant differences are indicated by * $p < 0.05$,
144 ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.001$ for obesogenic diets vs. control, and # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, or ### $p <$
145 0.001 for comparison between obesogenic diets. Results were statistically evaluated using SPSS 20
146 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and graphics were generated using GraphPad Prism 7 (GraphPad
147 Software Inc., San Diego, CA, USA) and STAMP 2.1.3 software.

148

149 **RESULTS**

150 **WD most effectively promoted obesity**

151 Excessive fat accumulation is a hallmark of obesity, and hyperphagia is a common characteristic among
152 rats fed palatable diets^{18,19}; therefore, we first measured food intake and animal weight. After 16 weeks,
153 the cumulative food intake (g/rat) was lower in rats fed obesogenic diets compared to the control diet
154 (Figure 1a). Conversely, cumulative energy intake (Kcal/rat) after 16 weeks was highest in CAF-fed rats
155 (Figure 1b). WD-fed rats gained significantly more weight than rats fed other diets (Figure 1c and d),
156 even though the CAF-fed rats consumed more calories, which suggests that weight gain occurred
157 regardless of calorie consumption. Fat accumulation and adiposity index were significantly higher in
158 WD-fed rats compared to other diets (Figure 1e and f). Notably, HFD and CAF, the diets most commonly
159 used to induce obesity in rodent models, did not cause a significantly greater amount of fat accumulation
160 compared to the control diet. Similarly, Sampey and colleagues showed that rats fed a HFD gained
161 similar weight to rats fed a matched low-fat diet (resembling our control diet), but gained more weight
162 than rats fed a commercial standard chow, pointing to the importance of choosing the correct control⁷. In
163 our study, the WD and HFD contain the same micronutrient base as the control diet, and therefore,
164 differences between these obesogenic diets and the control diet are not due to micronutrient content. In
165 contrast, CAF is composed of highly processed foods, which tend to be low in minerals, and vitamins^{6,9}
166 (i.e. CAF is not micronutritionally matched to the control diet). This possible lack of micronutrients may
167 have prevented weight gain compared to control diet. Thus, we believe that CAF models a diet rich in
168 highly processed foods, which is characteristic of Western societies^{6,16,20}, and not obesity per se.
169 Collectively, these data suggest that WD was the most efficient in inducing excessive adipose tissue
170 accumulation, the major hallmark of obesity.

171

172 **Obesogenic diets did not strongly affect serum lipid profile or levels of metabolites, alanine**
173 **aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST)**

174 We then determined the serum lipid profile (feeding/fasting TG, fasting low-density lipoprotein (LDL),
175 fasting HDL, fasting total cholesterol (TC)) and the levels of four serum metabolites (uric acid, urea,
176 creatinine, and albumin) as well as AST and ALT in rats fed these four different diets (Supplementary
177 Table S3). The data shown in Table S3 revealed increased feeding TG levels in the HFD- and CAF-fed

178 rats, an unexpected decrease in fasting TG levels in the HFD-fed rats, and a decrease in fasting TC in
179 CAF-fed rats.

180

181 **WD and CAF were the most palatable diets**

182 Because palatable foods lead to overeating and might contribute to the development of obesity^{18,21}, we
183 examined diet palatability, which is critical for determining food preference²¹. In food-preference tests,
184 both WD and CAF were more palatable than the control diet (Figure S1b and c), and the HFD (Figure
185 S1d and e), whereas HFD palatability was similar to the control diet (Figure S1a). Moreover, a
186 comparison of WD and CAF (Figure S1f) revealed a preference for CAF, which might be due to the
187 variety of food available in the CAF because WD and CAF contained similar amounts of salt, sugar, and
188 fat.

189

190 **WD and CAF induced marked hepatic steatosis**

191 Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a pathological syndrome primarily characterized by hepatic
192 steatosis (TG accumulation in liver cells) and occurs in 80%–90% of obese adult humans^{22,23}. Steatosis
193 scoring and histologic imaging revealed that all obesogenic diets induced fat accumulation in the liver
194 (Figure 2a and b), but direct liver TG measurement revealed that only WD and CAF increased liver TGs
195 (Figure 2c), corroborating previous findings⁷. As expected, liver fresh weight was significantly higher in
196 WD- and CAF-fed rats than in HFD- and control diet-fed rats (Figure 2d). Hence, we showed that WD
197 and CAF induce NAFLD more efficiently than HFD in Wistar rats.

198

199 **Effects of obesogenic diets on inflammation and adipokines**

200 We also measured the serum levels of leptin, adiponectin, TNF- α , IL-6, and IL-10 (Figure 3), because
201 these are considered key adipokines in obesity and related disorders²⁴. Serum TNF- α levels, in accord
202 with the increase in adipose tissue (Figure 1e and f), were higher in WD-fed rats than in CAF-fed rats
203 (Figure 3a). Conversely, among the obesogenic diets, only CAF induced a decrease in serum IL-10
204 (Figure 3b), although this might not be related to obesity because CAF did not induce a marked
205 accumulation of adipose tissue (Figure 1c-f). The TNF- α /IL-10 ratio (an inflammation index) did not
206 differ between the four tested diets (Figure 3c). Unexpectedly, serum IL-6 levels were similar between the
207 four diets (Figure 3d). Although DIO rats and obese humans have markedly increased serum leptin levels

208 relative to control rats and lean humans⁵, only WD induced leptinaemia in our study (Figure 3e).
209 Intriguingly, serum adiponectin levels, which are commonly lower in obese people than in lean people²⁵,
210 were slightly higher in WD-fed rats than in rats fed the other diets (Figure 3f). Nevertheless, in WD-fed
211 rats, the leptin/adiponectin ratio was increased, indicating an imbalance favouring leptin (Figure 3g).

212

213 **WD promoted a pre-diabetic condition**

214 We observed a slight fasting hyperglycaemia in both HFD- and WD-fed rats (Figure 3h), although a CAF
215 diet was previously shown to induce higher hyperglycaemia levels than a HFD in mice⁸. Insulin levels
216 and insulin resistance (estimated using HOMA-IR) were ~3-times higher in WD-fed rats than in rats fed
217 other diets (Figure 3i and j). The levels of carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product
218 formed from the non-enzymatic reaction between reducing sugars and proteins²⁶, were higher in HFD-
219 and WD-fed rats than in CAF- and control diet-fed rats (Figure 3k), in line with the effects on
220 hyperglycaemia. Collectively, these data indicate that WD led to a greater impairment in glucose
221 homeostasis than the other obesogenic diets.

222

223 **Serum IL-10 and liver TG levels were not correlated with adiposity index**

224 In this study, CAF induced a maximal reduction in serum IL-10 levels and a maximal increase in liver TG
225 levels, but these data were not correlated with adiposity index (Figure S2), implying that serum IL-10 and
226 liver TG levels might be modulated by CAF-intrinsic factors (such as presence of additives or lack of
227 essential nutrient) and not the obese state. The low weight, the high liver TG levels and the lack of
228 insulin-resistance induction in CAF-fed rats reminded us of the methionine-choline-deficient (MCD) diet
229 model that is widely used to induce NAFLD in rats; these rats present all three of the aforementioned
230 characteristics. Several diets are used to induce NAFLD, such as the MCD diet, choline-deficient (CD)
231 diet, or diets used for DIO models, but in contrast to MCD diet, DIO-model diets induce weight gain and
232 insulin resistance^{27,28}. Therefore, we hypothesized that CAF-fed rats could be choline deficient. Choline is
233 a nutrient essential for the formation of key compounds such as phosphatidylcholine, sphingomyelin, and
234 acetylcholine, and choline deficiency is associated with malnutrition^{29,30}. Thus, in order to reveal whether
235 CAF-fed rats experienced choline deficiency, we assessed choline levels both in the diets and in the rat
236 sera. Quantification of choline chloride and natural choline in the four diets (Supplementary Table S4)
237 revealed that choline content was lowest in CAF, intermediate in control diet, and highest in HFD and

238 WD. Serum phosphatidylcholine (the major fate of choline), levels were low in CAF-fed rats, and
239 intriguingly, also in the control diet-fed rats (Figure S3). Our finding suggests that this essential
240 compound may be evolved in the general state of CAF-fed rats, although this is likely not the only factor
241 because phosphatidylcholine amounts were also low in control rats. A possible explanation for this
242 finding is that low methionine intake can aggravate choline deficiency, because when dietary choline is
243 deficient, methionine can be used for choline synthesis³⁰; however, methionine levels were not assessed.

244

245 **Gut microbial diversity dropped drastically in CAF-fed rats**

246 Decreased gut microbial diversity has been linked to human obesity, insulin resistance, dyslipidaemia,
247 and inflammation, and also with rodent DIO models^{11,31,32}. In this study we found that gut microbial
248 diversity was drastically decreased in CAF-fed rats (Figure 4a and b), suggesting microbial community
249 dysbiosis, which is a disruption of gut microbiota composition that it is known to participate in the
250 pathogenesis of diverse diseases, including obesity, type 1 diabetes, and autism³³.

251

252 **Scatter plot of first and third principal components (PCs) and heatmap of relative abundances at 253 phylum level revealed grouping of CAF samples**

254 We used a PCA to assess whether the different diets produced distinct clusters in terms of the relative
255 abundances of gut microbiota at the phylum level. As a result, we found that the gut microbiota from
256 CAF-fed rats formed a distinct cluster from the microbiota of rats fed other diets (Figure 4c). This
257 separation was most apparent along the PC1 axis, which explained 89.8% of the total variation.
258 Moreover, the heatmap of relative abundances at the phylum level (Figure 4d) also separated CAF-fed
259 rats from rats fed other diets. These results, together with the diversity data, suggest that the CAF-fed rats
260 have widely different gut microbiota, which implies that CAF feeding leads to greater dysbiosis in rats.

261

262 **CAF induced major phylum- and genus-level changes in gut microbiota of rats**

263 In CAF-fed rats, the relative abundance of Firmicutes decreased, whereas the abundance of Bacteroidetes
264 increased, compared to HFD- or WD-fed rats (Figure 4e and f). Moreover, our data showed that TM7
265 abundance in gut microbiota was lower in CAF-fed rats than in WD-fed rats, and Euryarchaeota
266 abundance was lower in CAF-fed rats than in HFD- and WD-fed rats (Figure 4g and h).

267

268 **CAF-fed rats presented gut microbial community dysbiosis at the genus level**

269 In complete agreement with the results shown in Figure 4, Bacteroidetes genera (*Prevotella* and
270 *Parabacteroides*) bloomed, whereas the major Firmicutes genera (*Coprococcus*, *Oscillospira*, *Roseburia*,
271 *Ruminococcus*) dropped in CAF-fed rats (Figure S4). *Lactobacillus* (Firmicutes) also showed a tendency
272 to decrease in CAF-fed rats compared to rats fed the other obesogenic diets, and was higher in HFD-fed
273 rats than in control diet-fed rats (Figure S4d). Among Archaea, the abundance of *VadinCA11*, a genus
274 included in the phylum Euryarchaeota, was diminished in CAF-fed rats (Figure S4h), which agrees with
275 the decrease seen in Euryarchaeota (Figure 4h).

276

277 **The abundance of five genera was altered in gut microbiota from WD-fed rats**

278 The aforementioned findings showed that WD induced more obesity hallmarks than HFD and CAF
279 suggesting that WD induces an obesity phenotype more closely related to humans. Therefore, in order to
280 verify the relationship between the microbiota and obesity, we decided to evaluate alterations in gut
281 microbiota at the genus level specifically between the WD and control diet using a Student's *t*-test. This
282 analysis revealed that five genera were changed in abundance in the gut microbiota of WD-fed rats
283 relative to control: *Clostridium*, *Eubacterium*, *Anaerotruncus*, and *Holdemania* were increased and
284 *Candidatus arthromitus* was decreased (Figure 5).

285

286

287

288 **DISCUSSION**

289 Obesity is a metabolic disorder that predisposes to numerous diseases and due to its epidemic increase
290 worldwide has made it a major global public-health concern^{1,2}. Pre-clinically, obesity is studied using
291 several models, one of which is the DIO model. Diverse obesogenic diets have been used to create DIO
292 models, including HFDs, which vary in the source and proportion of fat, and CAFs, which are prepared
293 using various commonly consumed snacks^{5,6}. However, it is challenging to find a diet that encompasses
294 efficiency in inducing obesity and obesity-related disorders, experimental reproducibility, and effectively
295 models the human WD. Therefore, we aimed to design a diet that combines these three elements, and to
296 assess its efficiency in inducing obesity, obesity-associated metabolic disorders, and gut microbiota
297 alterations through a comparison with two traditional obesogenic diets.

298

299 The advantages and disadvantages of each of the diets are summarized in Table S5, a “pros and cons”
300 table prepared based on the literature and our data. The table lists ten parameters, which are discussed
301 individually. Obesity is described as excessive body-fat accumulation, but not all “obesogenic” diets
302 induce obesity^{5,34}. In this study, WD, but not HFD and CAF, generated excessive fat accumulation in rats
303 (Figure 1c-f), revealing the importance of diet choice. CAFs were found to induce obesity and obesity-
304 related dysfunctions more efficiently than HFDs^{7,8}. However, based on a consideration of all the
305 metabolic dysfunctions evaluated here, i.e. hepatic steatosis (Figure 2), inflammation (Figure 3a), fasting
306 hyperleptinaemia (Figure 3e), fasting hyperglycaemia (Figure 3h), fasting hyperinsulinemia (Figure 3i),
307 and dyslipidaemia (Supplementary Table S3), we conclude that these obesity-related disorders were
308 induced with low, moderate, and high efficiencies in rats fed HFD, CAF, and WD, respectively. Diet
309 palatability is an important food characteristic because it promotes overeating, which contributes to the
310 development of obesity^{6,21}. Palatability tests revealed that WD and CAF were the most palatable among
311 the tested diets (Figure S1). HFDs, which commonly vary between 20%–60% Kcal from fat, have been
312 widely used in DIO models but do not fully represent Western human food consumption habits⁵. For this
313 reason, CAFs have been considered by certain investigators to provide a superior DIO model, because
314 CAFs more accurately reflect the variety of highly palatable energy-dense foods prevalent in Western
315 society, and also more efficiently induce obesity^{6,7}. However, CAFs have been criticized for (1) being
316 difficult to standardize in terms of nutritional content, primarily because the type and manufacturing of
317 snacks varies from region to region; (2) they inherently contain food heterogeneity, which could lead to

318 each animal showing preference for a diet composition that differs in nutritional aspects from that
319 selected by every other animal, and this, in turn, might generate phenotypic differences within the
320 animals; and (3) they are composed of highly processed foods, which tend to be low in proteins, minerals,
321 and vitamins, and because of this animals might experience nutritional deficiencies^{6,9}.

322

323 It is known that the nutrient deficiencies may lead to development of obesity-associated metabolic
324 diseases^{35,36}. Thus, the differences noted in CAF, including the altered microbiome profile, may be due to
325 lack of nutrients. In addition to the aforementioned drawbacks, CAFs also contain diverse food additives
326 such as preservatives, colourings, flavourings, artificial antioxidants, and emulsifiers that are used in
327 industrialised foods, but are typically absent in control diets. In our CAF for example, we identified 17
328 additives (Supplementary Table S6), several of which are preservatives used to prevent microbial growth
329 in food. Thus, these preservatives might be responsible for the marked dysbiosis that we observed in
330 CAF-fed rats. Similarly, the additives as a whole, might be at least partly responsible for the metabolic
331 disorders observed in CAF-fed rats. Therefore, except where the aim is to study the effects of highly
332 processed foods, the results obtained using CAFs must be interpreted with care. In this regard, it might
333 also be preferable to use, as in our study, control diets featuring the same nutritional base of the
334 obesogenic diets, which would help in avoiding bias in the interpretation of results. For instance, Sampey
335 and colleagues obtained distinct results when they compared obesogenic diets with a commercial standard
336 chow or a matched low-fat diet⁷. Lastly, because CAFs are more prone to breaking and crumbling than
337 other diets, the diet can be easily lost among wood shavings (as we observed here) and this prevents
338 accurate measurement of food consumption.

339

340 The microbiota plays a critical role in the development of obesity and obesity-associated dysfunctions,
341 and transplantation of the microbiota from obese mice into lean mice is sufficient to make the lean mice
342 obese^{10,11,37-39}. However, our data revealed that certain obesogenic diets (e.g., our WD) might induce
343 obesity and obesity-related comorbidities in the absence of marked gut microbiota alterations (in this
344 study, the WD effect was different only when compared with control diet; Figure 5), corroborating
345 previous findings⁴⁰. Although mild compared to gut microbiota changes in rats fed CAF, these gut
346 microbiota changes may still be involved in the development of obesity and obesity-related disorders.
347 Conversely, other obesogenic diets (e.g., the CAF diet used here) can induce large gut microbiota changes

348 regardless of the obesity state. Collectively, these data suggest that diet was the driving force behind the
349 gut microbiota changes that we observed, and although rats fed CAF and WD had different gut
350 microbiota profiles, these profiles may both be involved in the metabolic changes found in each group.
351 Furthermore, we suggest that the marked dysbiosis developed in CAF-fed rats was potentially due to the
352 presence of several additives in the diet or even the lack of essential vitamins and minerals (Tables S5 and
353 S6). Lastly, we characterized gut microbiota in these three different diets and identified five genera that
354 might be involved in the pathogenesis of obesity (Figure 5).

355

356 Reproducibility has emerged as a growing concern in the scientific literature⁴¹⁻⁴⁴. Because the obesogenic
357 diets used for DIO models are not standardized (as discussed above), these diets induce phenotypes that
358 vary considerably among studies and therefore cannot be readily compared⁵. Consequently, such studies
359 evaluate, for example, the effects of diet X or Y, and not the effects of obesity. Accordingly, the rats in
360 our study showed completely different phenotypes depending on the diet they were fed. Therefore, diets
361 must be selected based on the study's purpose. We believe that it is an important goal to define an optimal
362 diet, because this would make obesity studies comparable. Based on our work, we propose the use of the
363 prototypic WD (designed here) for studying obesity and obesity-associated disorders in DIO models.
364 Conversely, CAFs could be used for examining the effects of excessive consumption of industrialised and
365 highly processed foods, which is characteristic of Western society^{6,16,20}, and not for obesity studies *per se*;
366 otherwise, caution should be exercised when interpreting the results and comparing them with the
367 findings from other studies. Moreover, the single HFD tested here revealed itself to be a poor model for
368 studying obesity. Finally, diet effects depend not only on diet composition but also on the rodent type,
369 strain and sex⁵. Female rodent models, for example, are more prone to DIO than males⁴⁵. Therefore, these
370 factors should also be taken into account for better metabolic characterization of these diets.

371 **ACKNOWLEDGMENTS**

372 Funding for this project was provided by the Brazilian funding agencies CNPq (402471/2013-0), CAPES,
373 FAPERGS (PRONEX 16/2551-0000 499-4) and PROPESQ-UFRGS.

374

375 **CONFLICT OF INTEREST**

376 The authors declare no conflict of interest.

377

378 **Supplementary information** is available at the *International Journal of Obesity* website.

379 **Supplementary Appendix-I:** Supplementary Material and Methods.

380 **Supplementary Tables:** Supplementary Tables

381 **Supplementary Figures:** Supplementary Figures

382

383 **REFERENCES**

- 384 1 Haslam DW, James WPT. Obesity. *Lancet* 2005; **366**: 1197–1209.
- 385 2 Smyth S, Heron A. Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nat Med* 2006; **12**: 75–80.
- 386 3 Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins BA *et al*. Origins and
387 evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am J Clin Nutr* 2005; **81**:
388 341–354.
- 389 4 National Center for Health Statistics. *Health, United States, 2015: with special feature on racial*
390 *and ethnic health disparities*. Hyattsville, MD, 2016.
- 391 5 Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of
392 human obesity in rodents. *Obesity* 2007; **15**: 798–808.
- 393 6 Nilsson C, Raun K, Yan F, Larsen MO, Tang-Christensen M. Laboratory animals as surrogate
394 models of human obesity. *Acta Pharmacol Sin* 2012; **33**: 173–181.
- 395 7 Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT *et al*.
396 Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose
397 inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity* 2011; **19**: 1109–1117.
- 398 8 Higa TS, Spinola A V, Fonseca-Alaniz MH, Evangelista FSA. Comparison between cafeteria and
399 high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. *Int J Physiol Pathophysiol*
400 *Pharmacol* 2014; **6**: 47–54.
- 401 9 Moore BJ. The cafeteria diet-an inappropriate tool for studies of thermogenesis. *J Nutr* 1987; **117**:
402 227–231.
- 403 10 Shen J, Obin MS, Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med*
404 2013; **34**: 39–58.
- 405 11 Sonnenburg JL, Bäckhed F. Diet–microbiota interactions as moderators of human metabolism.
406 *Nature* 2016; **535**: 56–64.
- 407 12 Lecomte V, Kaakoush NO, Maloney CA, Raipuria M, Huinao KD, Mitchell HM *et al*. Changes in
408 gut microbiota in rats fed a high fat diet correlate with obesity-associated metabolic parameters.
409 *PLoS One* 2015; **10**: e0126931.

- 410 13 Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK, Dumas M-E. Impact of the gut microbiota on
411 inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Med* 2016; **8**: 42.
- 412 14 National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th ed. The
413 National Academies Press (US), 2011.
- 414 15 Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of
415 the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-
416 76A rodent diet. *J Nutr* 1993; **123**: 1939–1951.
- 417 16 Grotto D, Zied E. The standard American diet and its relationship to the health status of
418 Americans. *Nutr Clin Pract* 2010; **25**: 603–612.
- 419 17 U.S. Department of Agriculture. Nutrient intakes from food: mean amounts of consumed per
420 individual, by gender and age. What we eat in America. Natl. Heal. Nutr. Exam. Surv. 2011-
421 2012. 2012; : 1–9.
- 422 18 Berthoud HR, Zheng H. Modulation of taste responsiveness and food preference by obesity and
423 weight loss. *Physiol Behav* 2012; **107**: 527–532.
- 424 19 Oliveros E, Somers VK, Sochor O, Goel K, Lopez-Jimenez F. The concept of normal weight
425 obesity. *Prog Cardiovasc Dis* 2014; **56**: 426–433.
- 426 20 Thorburn AN, Macia L, Mackay CR. Diet, metabolites, and ‘western-lifestyle’ inflammatory
427 diseases. *Immunity* 2014; **40**: 833–842.
- 428 21 de Macedo IC, de Freitas JS, da Silva Torres IL. The influence of palatable diets in reward system
429 activation: A mini review. *Adv Pharmacol Sci* 2016; **2016**: 1–7.
- 430 22 Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver
431 disease. *Dig Dis* 2010; **28**: 155–161.
- 432 23 Adams L a, Angulo P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabet Med* 2005; **22**:
433 1129–1133.
- 434 24 Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat*
435 *Rev Immunol* 2011; **11**: 85–97.

- 436 25 Gavrilu A, Chan JL, Yiannakouris N, Kontogianni M, Miller LC, Orlova C *et al.* Serum
437 adiponectin levels are inversely associated with overall and central fat distribution but are not
438 directly regulated by acute fasting or leptin administration in humans: Cross-sectional and
439 interventional studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**: 4823–4831.
- 440 26 Ahmad S, Khan MS, Akhter F, Khan MS, Khan A, Ashraf JM *et al.* Glycooxidation of biological
441 macromolecules: A critical approach to halt the menace of glycation. *Glycobiology* 2014; **24**:
442 979–990.
- 443 27 Teodoro JS, Varela AT, Rolo AP, Palmeira CM. High-fat and obesogenic diets: current and
444 future strategies to fight obesity and diabetes. *Genes Nutr* 2014; **9**: 406.
- 445 28 Veteläinen R, van Vliet A, van Gulik TM. Essential pathogenic and metabolic differences in
446 steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. *J Gastroenterol*
447 *Hepatol* 2007; **22**: 1526–1533.
- 448 29 Zeisel SH, da Costa K-A. Choline: an essential nutrient for public health. *Nutr Rev* 2009; **67**:
449 615–623.
- 450 30 Kucera O. Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol*
451 2014; **20**: 8364–8376.
- 452 31 Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but
453 reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 2008; **3**: 213–223.
- 454 32 Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G *et al.* Richness of human gut
455 microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 2013; **500**: 541–546.
- 456 33 DeGruttola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. Current understanding of dysbiosis in
457 disease in human and animal models. *Inflamm Bowel Dis* 2016; **22**: 1137–1150.
- 458 34 Rosini TC, Ramos da Silva AS, de Moraes C. Diet-induced obesity: rodent model for the study of
459 obesity-related disorders. *Rev Assoc Med Bras* 2012; **58**: 383–387.
- 460 35 Damms-Machado A, Weser G, Bischoff SC. Micronutrient deficiency in obese subjects
461 undergoing low calorie diet. *Nutr J* 2012; **11**: 34.
- 462 36 Via M. The Malnutrition of Obesity: Micronutrient Deficiencies That Promote Diabetes. *ISRN*

463 *Endocrinol* 2012; **2012**: 1–8.

464 37 Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host
465 metabolism. *Nature* 2012; **489**: 242–249.

466 38 Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA *et al*. Linking long-term
467 dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011; **334**: 105–108.

468 39 Brown K, DeCoffe D, Molcan E, Gibson DL. Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota
469 and the effects on immunity and disease. *Nutrients* 2012; **4**: 1095–1119.

470 40 Rabot S, Membrez M, Blancher F, Berger B, Moine D, Krause L *et al*. High fat diet drives
471 obesity regardless the composition of gut microbiota in mice. *Sci Rep* 2016; **6**: 32484.

472 41 Reardon S. A mouse’s house may ruin experiments. *Nature* 2016; **530**: 264–264.

473 42 Collins FS, Tabak LA. NIH plans to enhance reproducibility. *Nature* 2014; **505**: 612–613.

474 43 Casadevall A, Fang FC. Reproducible science. *Infect Immun* 2010; **78**: 4972–4975.

475 44 Servick K. Mouse microbes may make scientific studies harder to replicate. *Science* 2016.

476 45 Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev* 2010; **23**:
477 270–299.

478

479 **FIGURE LEGENDS**

480 **Figure 1 | Western diet (WD) was the most effective in promoting obesity. (A)** 16 week cumulative
481 food intake (g/rat). **(B)** 16 week cumulative energy intake (Kcal/rat). **(C)** Body weight (g) development
482 during treatment. **(D)** 16 week weight gain (g). **(E)** Total white adipose tissue (WAT) (g). **(F)** Adiposity
483 index (WAT weight/body weight). Data are expressed as means \pm SEM. **(A-D)** n = 12 and **(E-F)** n = 8.
484 Significant differences are indicated by * p < 0.05, ** p < 0.01 or *** p < 0.001 for obesogenic diets vs.
485 control, and # p < 0.05, ## p < 0.01 or ### p < 0.001 for comparison between obesogenic diets (ANOVA
486 followed by Tukey).

487

488 **Figure 2 | Cafeteria (CAF) and western diet (WD) induced more pronounced hepatic steatosis than**
489 **high fat diet (HFD). (A)** Representative liver sections stained with H&E. **(B)** Mean hepatic steatosis
490 score. **(C)** Liver triglycerides (mg/g protein). **(D)** Liver weight (g). Data are expressed as means \pm SEM.
491 **(A-B)** n = 4 and **(C-D)** n = 8. Significant differences are indicated by * p < 0.05, ** p < 0.01 or *** p <
492 0.001 for obesogenic diets vs. control, and # p < 0.05, ## p < 0.01 or ### p < 0.001 for comparison
493 between obesogenic diets (ANOVA followed by Tukey except hepatic steatosis for which a Chi-square
494 test was applied).

495

496

497 **Figure 3 | A Western diet led to an increase in serum levels of pro-inflammatory cytokine (TNF- α)**
498 **and was the only diet that induced insulin resistance as well as increased the leptin/adiponectin**
499 **ratio. (A)** Serum TNF- α expressed in pg/mL. **(B)** Serum IL-10 expressed in pg/mL. **(C)** Inflammatory
500 state measured as serum TNF- α /IL-10 ratio. **(D)** Serum IL-6 expressed in pg/mL. **(E)** Serum fasting leptin
501 expressed as ng/mL. **(F)** Serum fasting adiponectin expressed as μ g/mL. **(G)** Balance between the
502 adipokines of opposite effects was measured as the leptin/adiponectin ratio. **(H)** Serum fasting glucose
503 expressed in mg/dL. **(I)** Serum fasting insulin expressed in μ g/L. **(J)** Insulin resistance measured by the
504 homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index. **(K)** Evaluation of serum
505 advanced glycation end products assessed by N^ε-carboxymethyllysine levels (% of control). Data are
506 expressed as means \pm SEM. **(A-K)** n = 8-12. Significant differences are indicated by * p < 0.05, ** p <
507 0.01 or *** p < 0.001 for obesogenic diets vs. control, and # p < 0.05, ## p < 0.01, or ### p < 0.001 for

508 comparison between obesogenic diets (ANOVA followed by Tukey except for the non-parametric
509 distribution of IL-10 data, which the Kruskal-Wallis test was used).

510

511

512 **Figure 4 | Cafeteria diet (CAF) led to major changes in gut microbiota.** (A) Representative
513 rarefaction curves of estimated species richness (Chao1) of faecal samples. (B) Calculations of within-
514 community richness (α -diversity). Data are expressed as means \pm SEM. (A-B) Control and CAF (n = 4),
515 and HFD and WD (n = 3). Significant differences are indicated by * p < 0.05, ** p < 0.01 or *** p <
516 0.001 for obesogenic diets vs. control, and # p < 0.05, ## p < 0.01, or ### p < 0.001 for comparison
517 between obesogenic diets (ANOVA followed by Tukey). (C-D) Principal component analysis (PCA) and
518 heatmap of relative abundances at phylum level revealed grouping of cafeteria diet samples. (C) Scatter
519 plot of the principal component analysis of the phylum level (unclassified reads were removed) showing
520 all four treatment groups (D) Heatmap showing the relative abundances of bacterial phylum (unclassified
521 reads were removed) in faecal samples. Control and CAF (n = 4), and HFD and WD (n = 3). (E-H)
522 Relative abundances of statistically different phyla: (E) Firmicutes, (F) Bacteroidetes, (G) TM7 and (H)
523 Euryarchaeota. The box-plot shows the median of the data as a line, the mean of the data as a star, and
524 data points outside of the whiskers as crosses (E-G). Bar plots indicate the mean proportion of sequences
525 assigned to each feature (H). Control and CAF diet (n = 4) and HFD and WD diet (n = 3). Significant
526 differences are indicated by * p < 0.05, ** p < 0.01 or *** p < 0.001 for obesogenic diets vs. control, and
527 # p < 0.05, ## p < 0.01, or ### p < 0.001 for comparison between obesogenic diets (ANOVA followed by
528 Tukey-Kramer post hoc).

529

530 **Figure 5 | Gut microbial community differences between control and western diet (WD) at genera**
531 **levels.** Extended error bar plot showing all genera where Student's t-test produces a p-value > 0.5.
532 Unclassified reads were removed and family was chosen as the parent level (results were based on
533 number of sequences assigned to the family category). Control diet n = 4 and WD diet n = 3. p-values are
534 shown in the figure and p < 0.05 was considered statistically significant.

535

536

537

Table 1: Diet Composition

	Diet components (g/Kg of chow)	Control	High-Fat Diet (60% Kcal)	Cafeteria Diet	Western Diet	Approximate Human Western Diet Consumption (only for comparison) (*)
Protein	Soy protein	200	200	-	200	-
	Total	200	200	~ 180	200	~178
Lipids	Lard	0	315	-	180	-
	Soy oil	40	40	-	40	-
	Total	40	355	~ 210	220	~176.5
Carbohydrates	Corn starch	550	235	-	170	-
	Simple sugars ^a	100 ^a	100 ^a	-	300 ^a	~252
	Fiber	50	50	-	25 ^b	~34
	Total	700	385	~ 485	495	~607
Other components	Salt (sodium)	5.25 (2)	5.25 (2)	~ 19.6 (~7.7)	20 (7.86) ^c	~19.6 (~7.7)
	Vitamin mix	10	10	-	10	-
	Mineral mix	40	40	-	40	-
	Choline ^d	2 ^d	2 ^d	-	2 ^d	~0.675
	Methionine	3	3	-	3	-
	Lysine	3	3	-	3	-
	Cholesterol (mg)	0 ^e	0.296 ^e	-	0.169 ^e	~0.588
	Total (g)	998	998	~998	989	998

* Human western diet (only for comparison): mean amounts consumed per individual (men from 20 to 29 years old) in the United States, 2011-2012 (National Health and Nutrition Examination Survey - NHANES). In order to facilitate comparison, the values (taken from NHANES) were adapted to complete an amount of 998 grams.

^aSucrose was added to control, high-fat, and Western diet.

^bFiber was halved in our Western Diet because according Cordain and colleagues (2005) the content of ingested fiber in the United States is half of that recommended.

^cSalt was increased in our Western Diet to achieve a concentration close to the human Western diet.

^dCholine was added to control, high-fat, and Western diet in the choline chloride form (52% purity). The choline value of human Western Diet (0.675) was derived from NHANES data and therefore covers choline in different forms (100% purity).

^eThis cholesterol comes from the lard added to diets taking into account that 100 g of lard has 94 mg of cholesterol (no pure cholesterol was added).

The symbol “-” represents “unknown nutrients” whereas “~” represents “approximately”.

Figure 1

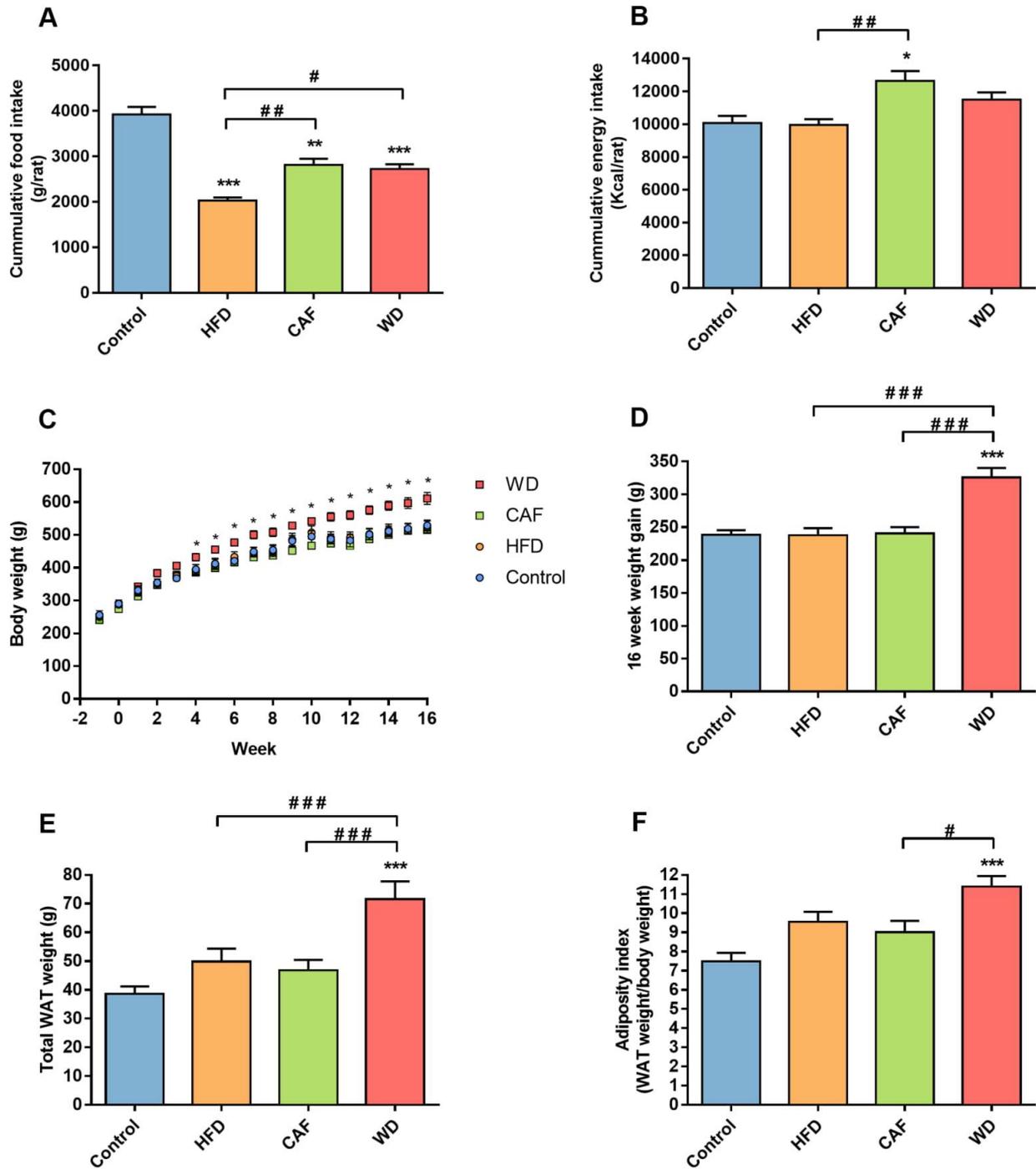


Figure 2

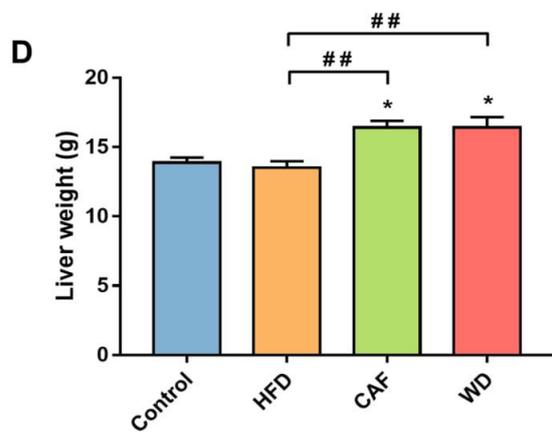
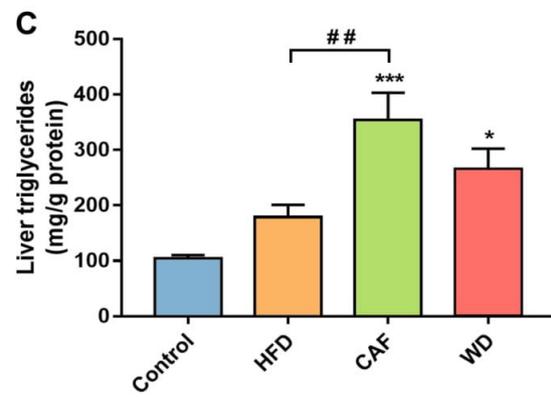
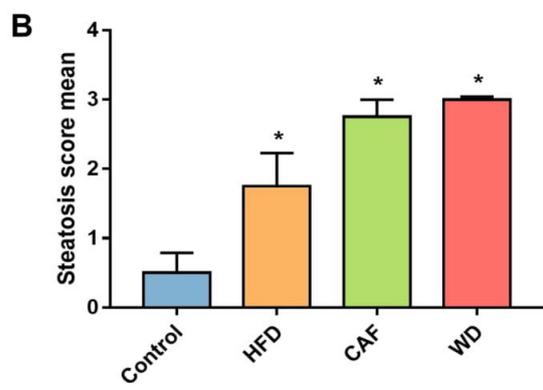
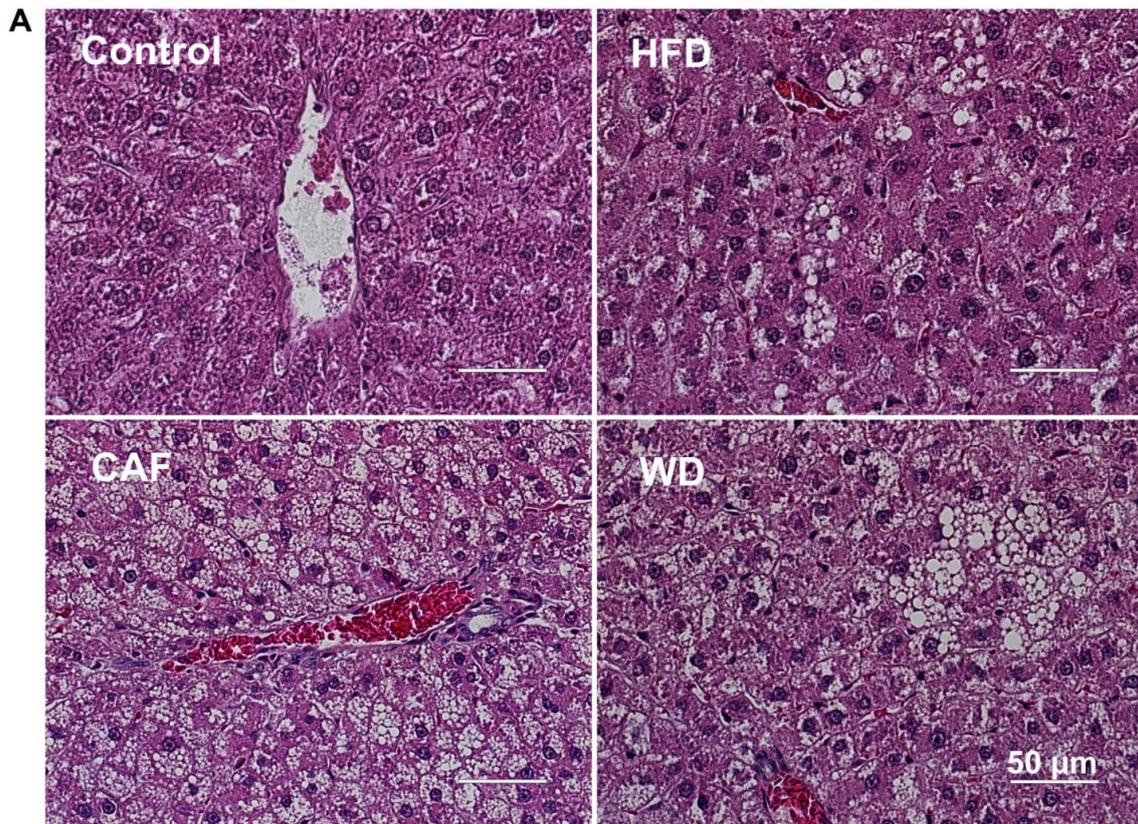


Figure 3

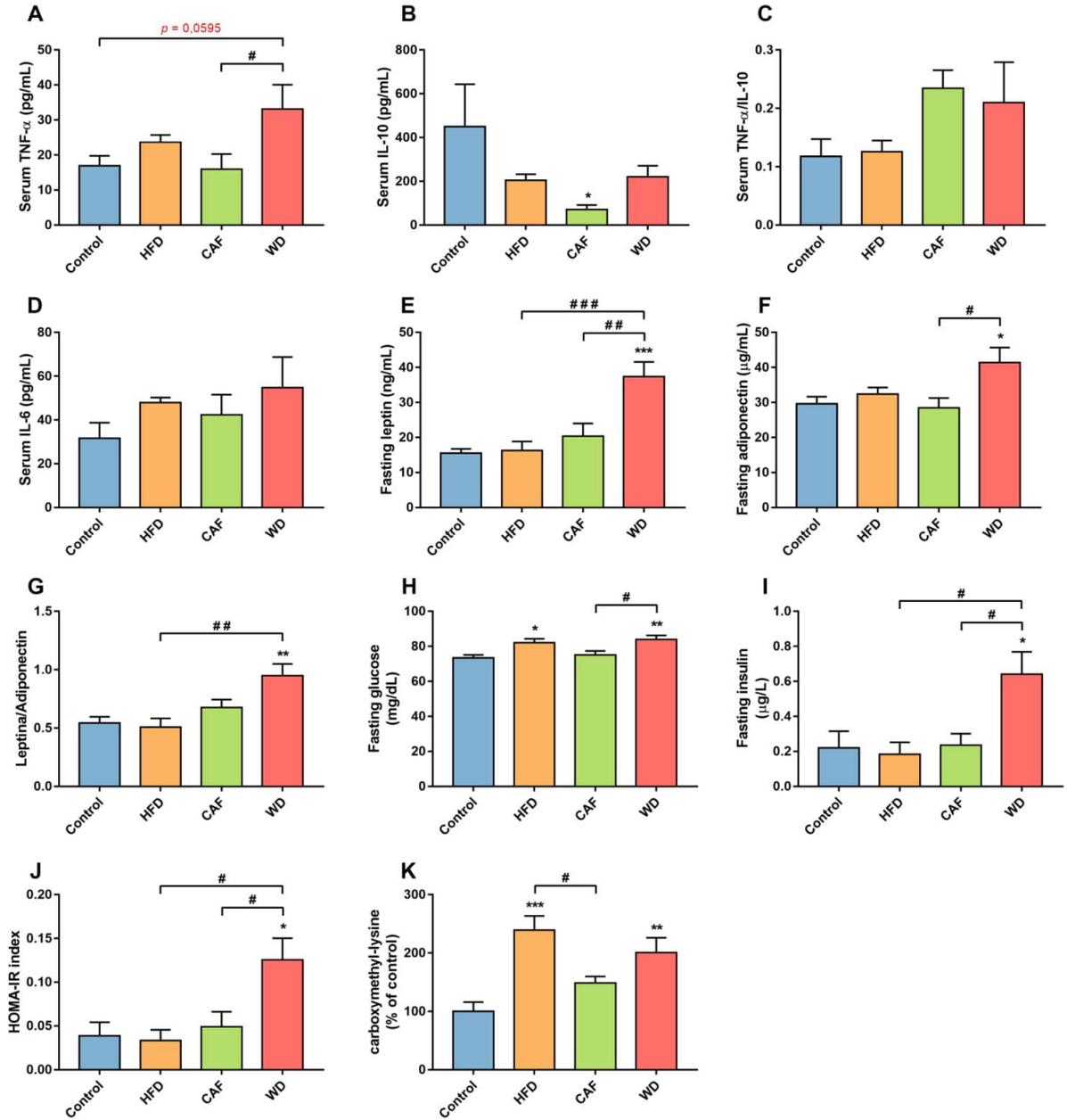


Figure 4

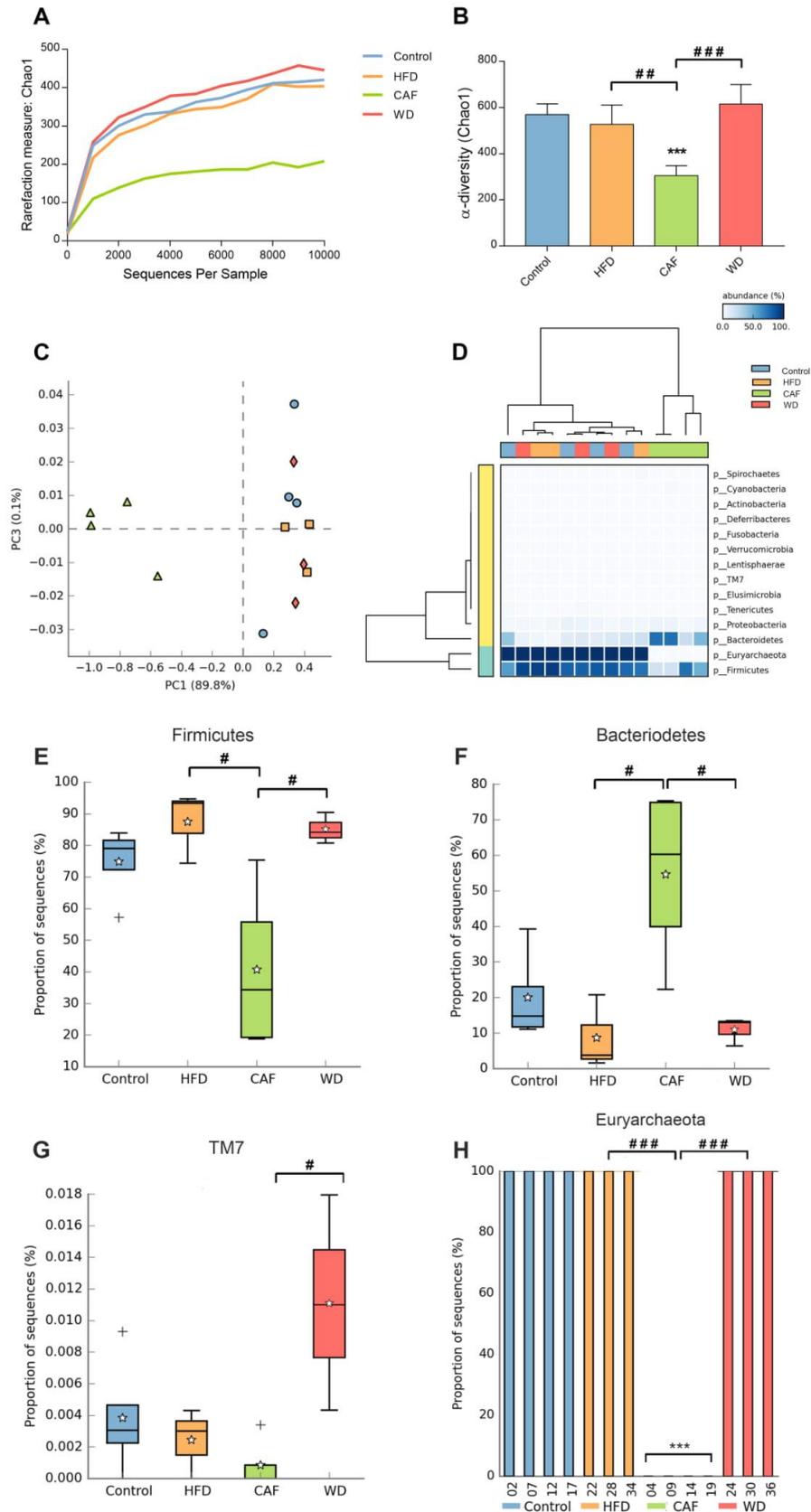
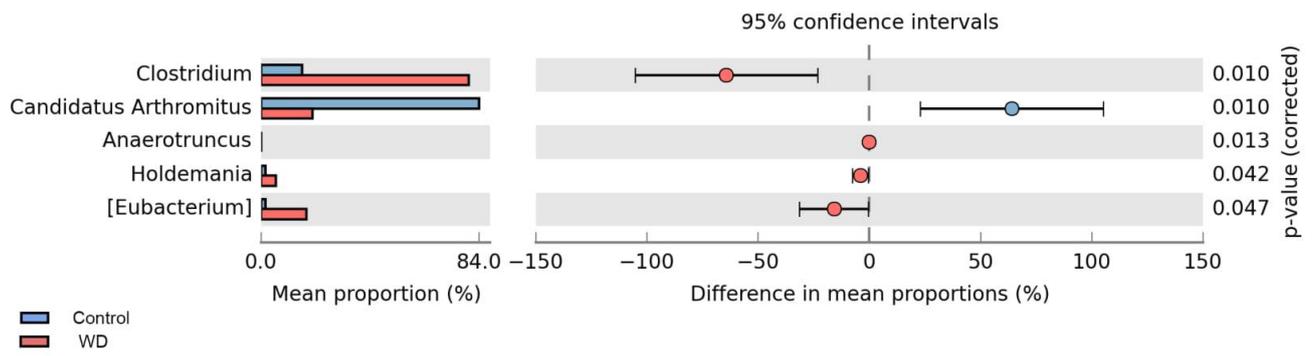


Figure 5



1 **Supplementary Materials and Methods**

2 **Body weight and food intake**

3 The amount of food consumed per cage was monitored by calculating the difference between
4 the weight of the food offered and the weight of the food removed two days later. Individual
5 animals were weighted once a week.

6

7 **Material collection**

8 After 16 weeks of the experimental diet, animals were fasted overnight (12 h) and 0.5 mL of
9 blood was collect via a tail snip procedure, whereby a cut is made 1 mm from the tip of the
10 tail using scalpel blade. Moreover, fresh fecal pellets were collected in clean boxes and stored
11 at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for DNA extraction and microbiota composition analysis. Serum was also
12 separated after blood clot formation by centrifugation at $2000\times g$ for 10 min at $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ and
13 stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Furthermore, after 18 weeks of the experimental diet, animals were
14 sacrificed by decapitation. Blood was collected and serum was separated by centrifugation
15 after clot formation as described. Liver and white adipose tissues (WATs) were rapidly
16 isolated, washed in ice-cold 50 mM phosphate buffer saline (PBS) (pH 7.4), patted dry, and
17 weighed before storage at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. A portion of the liver was also fixed in buffered 10%
18 formaldehyde (pH 7.4) for histologic analysis.

19

20 **Histology**

21 Formaldehyde fixed liver samples were dehydrated in increasing concentrations of ethanol
22 (70, 80, 90, 95, and 100%), diaphonized in xylol, and embedded in paraffin wax blocks
23 according to routine histological procedures. Serial coronal sections ($5\text{ }\mu\text{m}$ thick) of the
24 paraffin-embedded tissues were cut with a microtome and stained using hematoxylin–eosin
25 histochemical (H&E) methods. To evaluate histological changes, the sections were examined

26 microscopically and the best fields were photographed using a Microscopy EVOS™ FL Auto
27 Imaging System (AMAFD1000 – Thermo Fisher Scientific; MA, USA). Liver steatosis was
28 evaluated according to the nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) scoring system as
29 described by Kleiner and colleagues¹, whereby the percentage of steatosis area (<5%, 5-33%,
30 33-66%, and >66%) were scored as 0, 1, 2, and 3, respectively.

31

32 **Adiposity index**

33 To calculate the adiposity index, total body fat was divided by body weight as follows:
34 [(epididymal+visceral+retroperitoneal+omental)/final body weight] × 100.

35

36 **Lipid profile**

37 The fasting serum lipid profile (triglycerides (TG), total cholesterol, high-density lipoprotein
38 (HDL) cholesterol, and low-density lipoprotein (LDL) cholesterol), feeding serum TG, and
39 liver TG were determined using an automatic biochemical analyzer (Konelab® 30i, Thermo
40 Electron Corporation, Vantaa, Finland) with specific analysis kits by the Wiener lab group
41 (Rosario, Argentina). To measure liver TG, liver homogenate was diluted to 6 µg of
42 protein/µL in 50 mM PBS (pH 7.4).

43

44 **Serum metabolites, alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase 45 (AST)**

46 Serum uric acid (UA), creatinine, albumin, ALT, and AST concentrations were determined
47 using an automatic biochemical analyzer (Cobas 8000 C702, Roche Diagnostics, Mannheim,
48 Germany). Analyses were performed using the specified kits from Roche Diagnostics.

49

50 **Serum cytokines and hormone levels**

51 Serum tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6, and IL-10 levels were determined
52 with a rat ELISA kit from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Levels of leptin and
53 adiponectin were measured in fasting serum with a rat ELISA kit from Millipore (Billerica,
54 MA, USA).

55

56 **Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and N^ε-**
57 **carboxymethyllysine**

58 Fasting blood glucose concentrations were determined by using a portable glucometer
59 (Accucheck Active, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Fasting serum insulin
60 concentrations were determined with an ultra-sensitive rat insulin ELISA kit (Mercoxia AB,
61 Uppsala, Sweden). Insulin resistance (IR) was estimated according to the homeostatic model
62 assessment (HOMA) index using the following formula: fasting serum insulin ($\mu\text{g/L}$) \times
63 fasting plasma glucose (mg/dL)/405. Furthermore, N^ε-carboxymethyllysine was quantified by
64 indirect ELISA. In this analysis, serum was incubated in an ELISA plate and, after 24 h, the
65 plates were washed three times with Tween–Tris-buffered saline (TTBS, 100 mM Tris–HCl,
66 pH 7.5, containing 0.9% NaCl and 0.1% Tween-20). Subsequently, 200 μL of anti-N^ε-
67 carboxymethyllysine (Abcam, Cambridge, MA, USA) (1:1000) was added and incubated for
68 24 h at 4 °C. The plates were then washed three times with TTBS and incubated with rabbit
69 IgG peroxidase-linked secondary antibody (1:1000) for 2 h according to the manufacturer’s
70 instructions. After washing the plate three times with TTBS, 100 μL of substrate solution
71 (TMB spectrophotometric ELISA detection kit) was added to each well and incubated for 10
72 min. The reaction was stopped with 50 μL /well of 2 M sulfuric acid, and the plate read at 450
73 nm in a microplate reader.

74

75 **Food preference and choice**

76 For food preference, we used a different set of male Wistar rats (80 days old). Twelve
77 animals were separated into six cages with two animals per cage. Each cage corresponded to
78 a different treatment group. The animals received two different diets ad libitum, allowing
79 them to choose between the two types of food for six days (Control vs. high fat diet (HFD),
80 Control vs. Western diet (WD), Control vs. cafeteria diet (CAF), WD vs. CAF, HFD vs.
81 CAF, or WD vs. HFD). The food was weighed prior to feeding and the remaining quantity
82 was measured each day to evaluate consumption. The food was weighed every day at the
83 same time. Food consumption was measured per cage and the amount of food consumed was
84 divided by the number of animals per cage to determine the mean consumption per animal
85 and then divided by the average weight of the animals. To verify the amount of kilocalories
86 consumed per animal, we multiplied the amount of food ingested in grams by the caloric
87 content per gram of specific chow (in CAF, we multiplied the amount of food ingested in
88 grams by the mean caloric content per gram). The results were expressed as the average Kcal
89 intake/day/100 g rat weight during a five-day interval. This experiment was repeated three
90 times for the same animals, which were randomized between one experiment and another
91 after a washout period of 1 month. The first day of consumption was excluded as it is
92 considered an exploration phase during which the animal consumes the two diets equally in
93 order to evaluate flavor and texture and therefore does not represent the animal's preference.

94

95 **Choline analysis**

96 Choline levels obtained from food (choline chloride and natural choline) were evaluated by
97 liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) at the Laboratório ALAC
98 Ltda/Eurofins Scientific. Serum phosphatidylcholine was measured with a
99 phosphatidylcholine colorimetric assay kit (BioVision Inc, Milpitas, CA, USA).

100

101 **DNA extraction**

102 Fecal pellets were collected during the 16th week in aseptic conditions and stored at –80 °C
103 for two months. Microbial DNA extraction was performed using a QIAmp DNA stool mini
104 kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer’s protocol, and the subsequent
105 samples were stored at –20 °C for subsequent analysis. Total extracted DNA was quantified
106 with a Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) using a Qubit® dsDNA HS
107 Assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). DNA purity was determined by measuring the
108 A260/280 ratio using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific,
109 Waltham, MA, USA).

110

111 **Sequencing analysis**

112 The bacterial 16S rRNA hypervariable regions (V4) were amplified from the extracted DNA
113 samples by polymerase chain reaction (PCR) using 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA)
114 and 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) primers. In order to determine if
115 contamination occurred during the microbiome analysis, a sample devoid of any fecal content
116 (blank) was included in the PCR run. The PCR products were then purified, submitted to
117 emulsion PCR, and sequenced on an Ion Torrent Personal Genome Machine (Life
118 Technologies, Carlsbad, CA, USA). All of the raw data was exported as a unique fastq file
119 and submitted to the Brazilian Microbiome Project (BMP) analysis pipeline². The BMP
120 pipeline utilizes different scripts and software, such as QIIME and UPARSE, to evaluate the
121 16S rRNA phylogenetic profile. Briefly, sequences were demultiplexed and filtered based
122 upon size (200 bp) and quality scores. Operational taxonomic units (OTUs) were clustered
123 based on 97% similarity (at the species level) and then representative OTUs were assigned to
124 each phylogenetic identity using the Greengenes v. 13.8 database³. Differences in microbial

125 communities between groups were investigated using the STAMP software⁴. Alpha diversity
126 was performed with the respective QIIME scripts (alpha_diversity.py).

127

128 **References**

- 129 1 Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW *et al.*
130 Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver
131 disease. *Hepatology* 2005; **41**: 1313–1321.
- 132 2 Pylro VS, Roesch LFW, Morais DK, Clark IM, Hirsch PR, Tótola MR. Data analysis
133 for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. *J Microbiol*
134 *Methods* 2014; **107**: 30–37.
- 135 3 DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K *et al.*
136 Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible
137 with ARB. *Appl Environ Microbiol* 2006; **72**: 5069–5072.
- 138 4 Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P, Beiko RG. STAMP: statistical analysis of
139 taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* 2014; **30**: 3123–3124.

Supplementary Figures

Figure S1

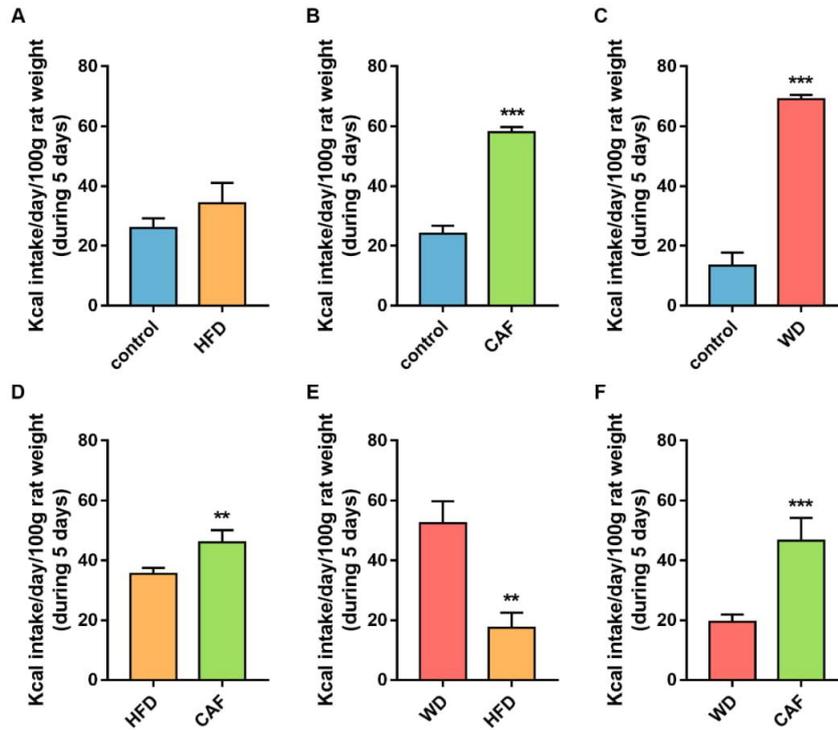


Figure S1: Western diet (WD) and cafeteria diet (CAF) proved to be the most palatable diets. (A, B and C) Food preference between control and obesogenic diets. Results are expressed as Kcal intake/day/100 g rat weight. Diets were offered in pairs where one of them was always the control. (D, E and F) Food preference between obesogenic diets. Results are expressed as Kcal intake/day/100 g rat weight. Obesogenic diets were offered in pairs. Data are expressed as means \pm SEM. Significant differences are indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or * $p < 0.001$ (ANOVA controlling the day effect.). These experiments were conducted using a different set of animals (male Wistar rats, 80 days old) over a period of five days.**

Figure S2

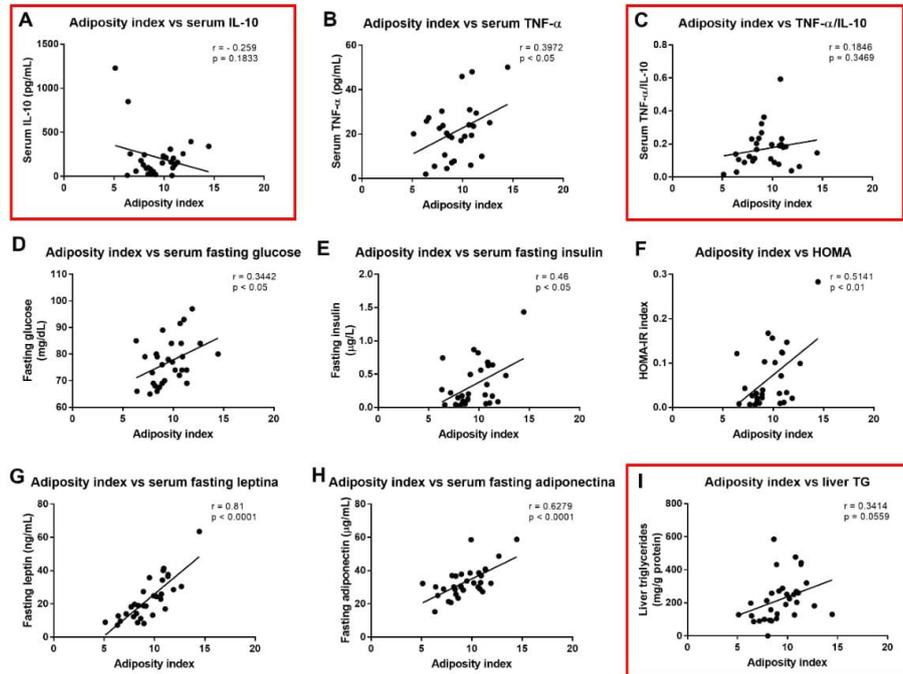


Figure S2: Linear regression plots and Pearson's correlation analysis between adiposity index and multiple metabolic parameters with the intention of verifying which parameters are more related to obesity than other factors. (A) Adiposity index vs. serum IL-10. (B) Adiposity index vs. serum TNF- α . (C) Adiposity index vs. serum TNF- α /IL-10. (D) Adiposity index vs. serum fasting glucose. (E) Adiposity index vs. serum fasting insulin. (F) Adiposity index vs. HOMA-IR. (G) Adiposity index vs. serum fasting leptin. (H) Adiposity index vs. serum fasting adiponectin. (I) Adiposity index vs. liver TG. Pearson's correlation coefficient (r) was considered significant when $p < 0.05$.

Figure S3

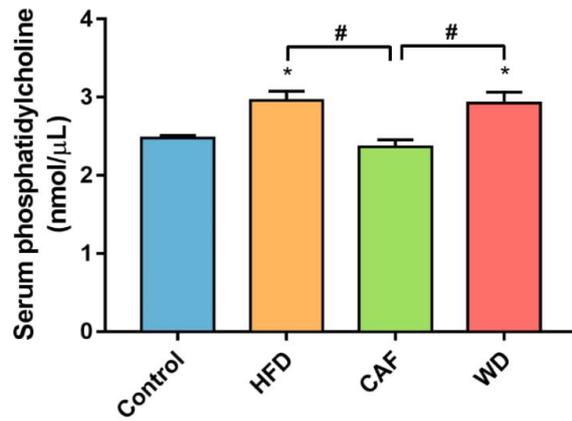


Figure S3: Western (WD) and cafeteria diet (CAF) presented higher serum phosphatidylcholine levels than control and high fat diet (HFD). (A) Serum phosphatidylcholine expressed as nmol/mL (n = 8). Data are expressed as means \pm SEM. Significant differences are indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$ for obesogenic diets vs. control, and # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, or ### $p < 0.001$ for comparison between obesogenic diets (ANOVA followed by Tukey).

Figure S4

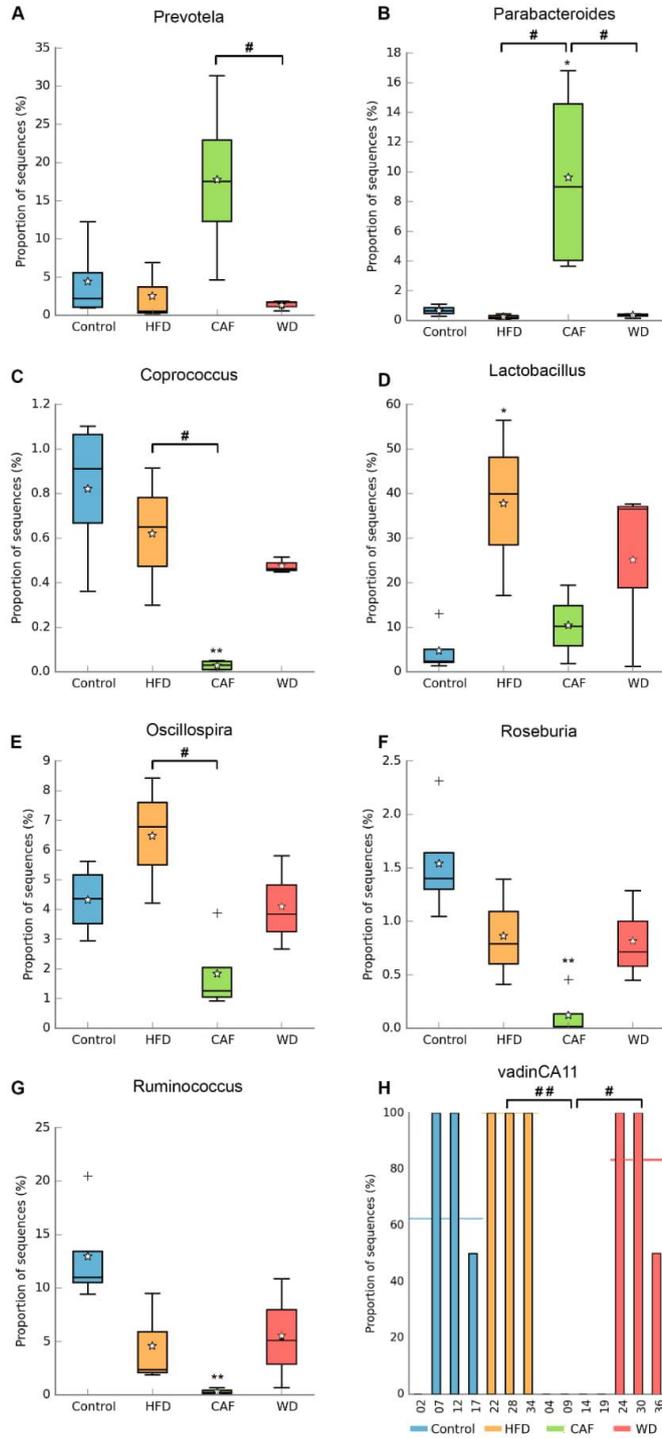


Figure S4: CAF-fed rats presented gut microbial community dysbiosis at genus level. (A-H) Relative abundances of statistically different genera: (A) Prevotella, (B) Parabacteroides, (C) Coprococcus, (D) Lactobacillus, (E) Oscillospira, (F) Roseburia, (G) Ruminococcus and (H) vadinCA11. The box-plot shows the median of the data as a line, the mean of the data as a star, and data points outside of the whiskers as crosses. Control and CAF diet n = 4 and HFD and WD diet n = 3. Significant differences are indicated by * p < 0.05, ** p < 0.01, or *** p < 0.001 for obesogenic diets vs. control, and # p < 0.05, ## p < 0.01, or ### p < 0.001 for comparison between obesogenic diets (ANOVA followed by Tukey-Kramer post hoc).

Supplementary Tables

Supplementary Table 1: Nutritional information for the snacks that make up the cafeteria diet according to the manufacturer.

Measures	Energy (Kcal)	Protein (g)	Carbohydrates (g)	Lipids (g)	Fiber (g)	Sodium (g)
Cheese (Prince)	102	8	1	7.4	0	0.16
Cake (Croissant)	144	1.9	22	5.5	0.2	0.107
Salami (Majestade)	172	16	0	12	0	0.624
Ham filled biscuit (Parati)	143	2.47	17	6.91	0.48	0.296
Puff biscuit (Zezé)	140	2.7	19	5.9	1	0.27
Cracker (Pioneiro)	128	3.1	24	1.7	0.9	0.088
Strawberry cookie (Nestle)	130	3.1	19	4.7	1.3	0.077
Mean	137	5.3	14.5	6.1	0.5	0.231

Values correspond to portions of 30 grams.

Supplementary Table 2: Sources of Kcal in each diet.

Macronutrients	Control	High Fat Diet (60% Kcal)	Cafeteria Diet	Western Diet
Protein	21 %	15 %	~ 16 %	17 %
Lipids	10 %	60 %	~ 42 %	42.5 %
Carbohydrates	69 %	25 %	~ 42 %	40.5 %
Total Kcal/Kg of chow	3760	5335	~4543	4660

Supplementary Table 3: Serum lipid profile, metabolites, ALT and AST.

Parameter	Control (n=7-9)	HFD (n=7-9)	CAF (n=7-9)	WD (n=7-9)
Feeding TG (mg/dL)	115.1 ± 13.1	196.6 ± 24.8*	206.7 ± 14.5*	167.5 ± 15.9
Fasting TG (mg/dL)	160.3 ± 22.2	73.8 ± 6.0*	127.2 ± 13.5	124.5 ± 7.4
Fasting LDL (mg/dL)	13.8 ± 1.2	16.7 ± 0.9	13.5 ± 1.6	13.6 ± 0.9
Fasting HDL (mg/dL)	26.2 ± 1.4	23.6 ± 1.7	20.5 ± 1.4	23.0 ± 1.0
Fasting total cholesterol (mg/dL)	69.7 ± 2.7	60.3 ± 2.5	55.9 ± 2.8*	61.2 ± 2.2
Uric acid (mg/dL)	1.4 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.07	1.2 ± 0.04
Urea (mg/dL)	41 ± 1.1	33.5 ± 1.7	35.3 ± 3.7	33.13 ± 0.5
Creatinine (mg/dL)	0.3 ± 0.007	0.4 ± 0.01#	0.38 ± 0.01	0.34 ± 0.01
Albumin (g/dL)	4.5 ± 0.09	4.3 ± 0.06*	4.4 ± 0.03	4.3 ± 0.03*
ALT (U/L)	51.2 ± 4.9	63.3 ± 8.5	47.2 ± 3.8	50.8 ± 3.8
AST (U/L)	293.7 ± 33.5	330.8 ± 50.1	291.7 ± 31.9	247 ± 19.7

Values are presented as mean ± SEM. * p < 0.05 vs. control and # p < 0.05 vs. WD

Supplementary Table 4: Choline levels in diets.

Parameter	Control	HFD	CAF	WD
Choline chloride (mg/kg)	1420	2450	722	2180
Natural choline (mg/kg)	1060	1830	539	1628

Results from food analysis.

Supplementary Table 5: Characterization of obesogenic diets

Diets	HFD	CAF	WD
Efficiency in inducing obesity ^a	<u>Low</u>	<u>Low</u>	High
Efficiency in inducing obesity-related disorders ^a	<u>Low</u>	<u>Moderate</u>	High
Palatability ^{a,6}	<u>Low</u>	High	High
Human Western diet similarity ^{a,6}	<u>Low</u>	High	High
Reproducibility ^{6,9}	High	<u>Low</u>	High
Food heterogeneity ^{a,6}	No	<u>yes</u>	No
Phenotypic heterogeneity ^{a,6,9}	Low	<u>Moderate</u>	Low
Lack of vitamins and/or minerals ^{a,6,9}	No	<u>Possibly</u>	No
Presence of preservatives, colorings, flavorings, artificial antioxidants, etc. ^a	No	<u>Yes</u>	No
Crumbly ^a	No	<u>Yes</u>	No
Appropriate obesogenic diet	x	x	√

Characterization was based on this study and literature. Negative points are highlighted in red underlined italic.

^a Our data contributed to the characterization. Superscript numbers are literature references.

Supplementary Table 6: Additives present in the cafeteria diet used in this study.

Additive category	Additives
Preservatives	Calcium propionate*, tert-butylhydroquinone, sodium erythorbate, sodium metabisulfite* and sodium nitrite*
Stabilizer	Soy lecithin
Flavor enhancer	Monosodium glutamate
Flavoring	Unspecified artificial flavoring
Coloring	Natural coloring carmin
Baking powder	Monocalcium phosphate, sodium bicarbonate and ammonium bicarbonate
Flour enricher	Reduced iron and folic acid
Acidifier	Citric acid
Humectant	Propylene glycol
Stabilizer	Calcium carbonate

* prevents microbial growth

Capítulo II

Pedido de patente depositado

Composição indutora de obesidade em ratos e uso da composição para o preparo de uma composição para induzir obesidade em ratos

(Número do processo: BR10.2018.000453-0)



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2018 000453 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 92969856000198

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AV. PAULO GAMA Nº 110, 6º ANDAR, CENTRO, PORTO ALEGRE,
RS, BRASIL

Cidade: Porto Alegre

Estado: RS

CEP: 90040-060

País: Brasil

Telefone: (51)3308.3800

Fax: (51)3308.4237

Email: propriedadeintelectual@ufrgs.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): COMPOSIÇÃO INDUTORA DE OBESIDADE EM RATOS E USO DA
COMPOSIÇÃO PARA O PREPARO DE UMA COMPOSIÇÃO PARA
INDUZIR OBESIDADE EM RATOS

Resumo: A presente invenção descreve uma composição alimentícia para
dieta indutora de obesidade útil para estudos de obesidade em
animais de laboratório principalmente ratos da linhagem Wistar. A
presente invenção se situa nos campos da Medicina e Nutrição.

Figura a publicar: 1

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 2

Nome: RAFAEL CALIXTO BORTOLIN

CPF: 01778785093

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: João Alfredo 694, apto 403

Cidade: Porto Alegre

Estado: RS

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: 00159410@ufrgs.br

Inventor 2 de 2

Nome: JOSÉ CLÁUDIO FONSECA MOREIRA

CPF: 31758444134

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Eroni Soares Machado no. 300 casa 24

Cidade: Porto Alegre

Estado: RS

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: 00006866@ufrgs.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 09/01/2018 às 12:18, Petição 870180001879

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante de pagamento GRU.pdf
Relatório Descritivo	RD - Dieta animal indutora de obesidade útil-FINAL.pdf
Reivindicação	Reivindicações - Dieta animal indutora de obesidade útil-FINAL2.pdf
Resumo	Resumo - Dieta animal indutora de obesidade útil-FINAL3.pdf
Desenho	Figuras - Dieta animal indutora de obesidade útil-FINAL4.pdf
Declaração de período de graça	Artigo_período_de_graça.pdf
Portaria	PORTARIA + DOU.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de Divulgação Anterior Não Prejudicial

- Artigo 12 da LPI - Período de Graça.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

___ SIAFI2017-DOCUMENTO-CONSULTA-CONDOC (CONSULTA DOCUMENTO)_____

28/11/17 15:49 USUARIO : RAFAEL
DATA EMISSAO : 28Nov17 TIPO : 1 - PAGAMENTO NUMERO : 2017GR800289
UG/GESTAO EMITENTE : 153114 / 15235 - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO
UG/GESTAO FAVORECIDA : 183038 / 18801 - INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDU
RECOLHEDOR : 153114 GESTAO : 15235
CODIGO RECOLHIMENTO : 72200 - 6 COMPETENCIA: NOV17 VENCIMENTO: 06Dez17
DOC. ORIGEM: 153114 / 15235 / 2017NP005070 PROCESSO : 522111/2017-21
RECURSO : 1
(=) VALOR DOCUMENTO : 70,00
(-) DESCONTO/ABATIMENTO:
(-) OUTRAS DEDUCOES :
(+) MORA/MULTA :
(+) JUROS/ENCARGOS :
(+) OUTROS ACRESCIMOS :
(=) VALOR TOTAL : 70,00
NOSSO NUMERO/NUMERO REFERENCIA : 00029409161710795858
CODIGO DE BARRAS : 89610000000 0 70000001010 3 95523127220 9 00360640000 4
OBSERVACAO
522111/2017-21 registro contábil do doc 29409161710795858 de 23/11/2017 ref. d
epósito de pedido de patente, cód. operação: 200, cfe. encaminhamento do orden
LANCADO POR : 80905951034 - VALQUIRIA NUNES UG : 153114 28Nov2017 11:05
PF1=AJUDA PF3=SAI PF2=DADOS ORC/FIN PF4=ESPELHO PF12=RETORNA

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

COMPOSIÇÃO INDUTORA DE OBESIDADE EM RATOS E USO DA COMPOSIÇÃO PARA O PREPARO DE UMA COMPOSIÇÃO PARA INDUZIR OBESIDADE EM RATOS

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção descreve uma nova dieta indutora de obesidade. A presente invenção se situa nos campos da Medicina e Nutrição.

Antecedentes da Invenção

[0002] A obesidade é uma desordem metabólica que predispõem as pessoas a inúmeras doenças, tais como diabetes, doenças cardiovasculares, câncer, entre outras. Sua prevalência tem aumentado mundialmente em proporções epidêmicas. Por conta disso tem se tornado um dos maiores problemas de saúde pública do mundo.

[0003] Estudos científicos para encontrar terapias adequadas para o tratamento da obesidade têm aumentado a cada ano e geralmente são usados modelos animais para o estudo de obesidade. Um dos modelos que reflete melhor a obesidade humana é o modelo de obesidade induzido por dieta (em inglês conhecido como DIO - diet-induced obesity).

[0004] Este modelo se baseia em fornecer uma dieta hipercalórica aos animais durante um período de tempo que varia entre 1 e 6 meses geralmente. Após este modelo animal ser inventado, novas dietas foram criadas afim de buscar um modelo mais eficiente e/ou realista da obesidade humana.

[0005] Atualmente duas dietas são mais utilizadas, uma delas é conhecida como dieta rica em gordura (do inglês HFD - high-fat diet), a qual apresenta uma quantidade elevada de gordura na dieta; a outra dieta é conhecida como dieta de cafeteria (do inglês CAF - cafeteria diet), a qual é composta por diversos alimentos palatáveis, hipercalóricos e altamente industrializados (por exemplo, queijo, salame, bolo, bolacha recheada, salgadinhos, etc.).

[0006] A composição da dieta rica em gordura não é padronizada e, portanto,

pode variar de um estudo para o outro em relação à quantidade e o tipo de gordura, podendo gerar fenótipos diferentes entre animais de estudos diferentes, dessa forma dificultando a comparação entre os diferentes trabalhos. Uma outra desvantagem da dieta rica em gordura é que quando comparada com outras dietas indutoras de obesidade, ela é, frequentemente, menos eficiente em induzir a obesidade.

[0007] A dieta de cafeteria por sua vez, tem sido criticada por ser menos padronizada do que a dieta rica em gordura, já que cada pesquisador faz a sua própria composição de alimentos industrializados, pois estes variam de região para região. Além disso, o consumo do tipo de alimento pode variar de um animal para outro devido a preferência de cada animal.

[0008] Outra desvantagem desta dieta se baseia no fato de que os animais podem apresentar deficiências nutricionais de proteína, vitaminas e minerais, uma vez que alimentos altamente industrializados são pobres nestes componentes. Por último, deve ser salientado que a dieta de cafeteria apresenta vários aditivos alimentares (corantes, flavorizantes, conservantes, emulsificantes, etc.), os quais não estão presentes na ração controle dos animais e, portanto, poderiam dificultar a interpretação dos resultados.

[0009] Devido a esses fatos, se faz interessante o desenvolvimento de novas dietas indutoras de obesidade.

[0010] Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

[0011] O documento de patente de número de publicação **CN104705258-A**, intitulado “Construction method and application of diet-induced insulin resistance model” revela uma dieta para induzir resistência à insulina em ratos.

[0012] O documento de patente de número de publicação **CN102812921-A** intitulado como “Method for establishing type 2 diabetes animal model and application of type 2 diabetes animal model in screening of blood sugar reducing medicaments”, revela dietas para induzir diabetes tipo 2 em ratos. Bem como os documentos **CN103461660-A**, **WO2009135778-A1** e

CA2551868 intitulados respectivamente como “Diabetes-inducing high-fat feed and application thereof to preparation of diabetic foot ulcer rat experimental model”, “Animal model for diabetes ” e “Method for producing diabetic rat with high fat diet”.

[0013] O documento de patente de número de publicação **CN104509705-A**, intitulado “Application of composite high-fat forage to construct non-alcoholic fatty liver disease rat model” revela dietas para induzir doença do fígado graxo não alcoólicas em ratos. Bem como os documentos **CN102696535-A**, **CN102106476** e **CN104509705** intitulados como “Method for constructing tree shrew nonalcoholic simple fatty liver animal models”, “High-fat feed and application thereof in building animal model with non-alcoholic fatty liver” e “Application of composite high-fat forage to construct non-alcoholic fatty liver disease rat model”.

[0014] O documento de patente de número de publicação **JP2009178143-A**, intitulado “steatohepatitis-liver cancer model animal” revela dietas para induzir esteatose hepática em ratos. Bem como o documento de patente de número de publicação **WO2017066228A2** intitulado como “a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis and uses thereof”.

[0015] O documento de patente de número de publicação **CN106234298-A** intitulado “Method for establishing hyperlipidaemia rat model in short term” revela dietas para induzir hiperlipidemia em ratos.

[0016] O documento de patente de número de publicação **CN102771673-A** intitulado “High-fat purified feed establishing metabolic syndrome animal model and processing technology” revela dietas para induzir síndrome metabólica em ratos. Bem como o documento de patente de número de publicação **CN0288232** intitulado como “High-fat purified feed establishing metabolic syndrome animal model and processing technology”.

[0017] O documento de patente de número de publicação **CN104509705-A** intitulado “Application of composite high-fat forage to construct non-alcoholic fatty liver disease rat model” revela dietas para induzir a doença do fígado

graxo não alcoólica em ratos.

[0018] O documento de patente de número de publicação **CN103416352** intitulado como “Animal model of hypertension comprehensively caused by high-salt, high-sugar and high-fat diet”, revela dietas para induzir hipertensão em ratos.

[0019] Estes documentos de patente aqui citados revelam dietas baseadas na alteração das concentrações de açúcar, frutose, gordura, colesterol ou mais de um desses nutrientes concomitantemente, e muitas delas utilizam fármacos além da dieta para conseguir desenvolver as disfunções previstas em cada uma das patentes. Entretanto, nenhuma dessas patentes aqui avaliadas revelam métodos desenvolvidos para induzir especificamente obesidade e desordens associadas a ela como característica principal exclusivamente através de dieta.

[0020] O documento de patente de número de publicação **JP2005110632** intitulado como “model animal for obesity-related diabete” revela um modelo de obesidade para camundongo que possuem peso maior que a média quando expostos a uma dieta rica em gordura. Ou seja, essa patente envolve dois processos: alteração na dieta e escolha dos animais. É um modelo usado para se estudar indivíduos propensos a obesidade enquanto o modelo aqui proposto é usado para estudar indivíduos obesos, sejam eles propensos ou mais resistentes a obesidade, ou seja, são modelos que estudam indivíduos em condições diferentes. A dieta desenvolvida na presente invenção pode ser aplicada em ratos independentemente de seu peso, não sendo assim selecionados indivíduos que já se apresentam ser propensos a obesidade. Além disso é relevante ressaltar que algumas dietas, como a HFD, funcionam em camundongo, mas não funcionam tão bem em ratos.

[0021] O documento de patente de número de publicação **CN102792919** intitulado como “Method of establishing gnotobiotic animal obesity model and application of model” revela um modelo de obesidade através de inoculação por bactéria. Este modelo também envolve dois processos (alteração na dieta e

inoculação bacteriana), enquanto que a presente invenção envolve apenas um processo, o que facilita a execução do modelo. Além disso, a composição da dieta utilizada nessa patente não é a mesma da presente invenção. Por fim, estudos atuais mostram que não existe uma população microbiana única entre os obesos, portanto uma inoculação com bactérias específicas diminuiria a variação natural bacteriana.

[0022] As empresas **Prag Soluções, Envigo e Research Diets** revelam várias dietas para a indução da obesidade, em que estas dietas se diferenciam entre si pela quantidade de gordura, açúcar e colesterol, bem como pelo tipo de gordura, entretanto nenhuma delas apresenta alteração na quantidade de fibras e de sal como na presente invenção.

[0023] Essas patentes aqui citadas se diferenciam da presente invenção no que se refere a aplicação, sendo que no caso da presente invenção se objetiva a indução de obesidade. Além disso, a composição da dieta revelada na presente invenção também se diferencia dos documentos dados como anterioridade. Apesar de os documentos citados também apresentarem grandes quantidades de gordura e sacarose, e em diversas proporções, na sua composição, nenhuma dessas dietas possuem alterações na quantidade de fibras e sal como na presente invenção.

[0024] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

[0025] Assim esta nova invenção se mostra como uma alternativa para resolver os diversos problemas e inconvenientes presentes nas dietas já existentes na intenção de avançar em direção a uma dieta ideal através da solução aos problemas de baixa eficiência em induzir obesidade e disfunções associadas a obesidade, de baixa palatabilidade (Figura 1) e de baixa similaridade com a dieta ocidental humana presentes na dieta rica em gordura. Bem como, resolve os problemas de baixa reprodutibilidade, de níveis

inadequados de vitaminas, proteínas e minerais, e da presença de aditivos alimentares encontrados na dieta de cafeteria.

Sumário da Invenção

[0026] Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir de uma dieta indutora de obesidade útil em animais de laboratório, principalmente ratos da linhagem Wistar.

[0027] A dieta da presente invenção apresenta um aumento na quantidade de sal e uma diminuição na quantidade de fibras, além de um aumento na quantidade de gordura e açúcar. Em proporções que se mostraram ser bastante eficientes na indução de obesidade em ratos.

[0028] O aumento na quantidade de sal na dieta se comparado com as dietas atuais tem por propósito aumentar a palatabilidade da dieta, a qual está associada à hiperfagia que por sua vez está associada à obesidade.

[0029] Enquanto que a diminuição na quantidade de fibras por sua vez está relacionada ao aumento de peso, uma vez que a observada redução de fibras na dieta da população humana pode estar por trás da crescente epidemia de obesidade, como sugerido em diversos trabalhos científicos.

[0030] Além disso, estes dois nutrientes foram adicionados à dieta baseados na quantidade referente ao consumo humano destes nutrientes, assim tornando ela mais similar a dieta ocidental humana.

[0031] A mudança nos hábitos alimentares tem sido indicada como a grande causa da epidemia global de obesidade. O consumo de açúcar tem aumentado na mesma proporção da epidemia global de obesidade e a conexão com a obesidade tem uma base bioquímica forte. Ao ingerir açúcares simples como a sacarose os níveis de glicose no sangue se elevam imediatamente e se esse açúcar não é usado ele é estocado na forma de gordura no nosso tecido adiposo.

[0032] O consumo de gordura também tem aumentado apesar de ser em

proporções menores que a do açúcar. Porém a gordura tem 9 calorias por grama enquanto carboidratos tem apenas 4 calorias por grama. Ou seja, qualquer consumo a mais de gordura pode levar a um aumento no peso, principalmente se for associado ao consumo de carboidratos. É facilmente encontrado na literatura científica trabalhos mostrando a conexão entre consumo de gordura e obesidade. Além disso, camundongos (os quais são usados como modelos em estudos de obesidade) engordam facilmente ao acrescentar apenas gordura a sua ração padrão.

[0033] Esta nova dieta possui diversas vantagens como a alta eficiência em induzir obesidade, alta eficiência em induzir disfunções associadas à obesidade, alta palatabilidade, alta similaridade com a dieta ocidental humana, alta reprodutibilidade, adequada nutricionalmente e sem aditivos alimentares.

[0034] Levando em conta estes fatores esta nova dieta apresenta uma qualidade maior do que as demais testadas no que se refere aos meios de indução a obesidade.

[0035] É revelado assim uma nova composição de dieta indutora de obesidade em ratos com altas quantidades de sal na sua composição e baixas quantidades de fibras conforme definido e revelado na descrição detalhada e pelas figuras do presente pedido de patente.

[0036] É um objeto da presente invenção uma composição de dieta indutora de obesidade em ratos.

[0037] É um outro objeto da presente invenção o método de indução de aumento de peso em ratos.

[0038] É um outro objeto da presente invenção o uso de uma composição de dieta indutora de obesidade em ratos.

[0039] Ainda, o conceito inventivo comum a todos os contextos de proteção reivindicados se refere a uma composição, um método de preparo e o uso de uma nova dieta indutora de obesidade em ratos. Sendo que todos esses contextos aqui reivindicados resolvem da mesma forma o problema da baixa eficiência em induzir obesidade em ratos.

[0040] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[0041] Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente, são apresentadas as presentes figuras:

[0042] A figura 1 mostra uma série de gráficos em que a dieta da presente invenção está representada pela sigla “WD”, (A) 16 semanas de consumo alimentar cumulativo (g / rato). (B) Ingestão cumulativa de energia de 16 semanas (Kcal / rato). (C) Peso corporal (g) desenvolvido durante o tratamento. (D) Ganho de peso de 16 semanas (g). (E) Tecido adiposo branco total (WAT) (g). (F) Índice de adiposidade (peso WAT / peso corporal). Os dados são expressos como médias \pm SEM. (AD) n = 12 e (EF) n = 8. As diferenças significativas são indicadas por * p <0,05, ** p <0,01 ou *** p <0,001 para dietas obesogênicas versus controle e # p <0,05, # # p <0,01 ou ### p <0,001 para comparação entre dietas obesogênicas (ANOVA seguida de Tukey).

[0043] A figura 2 mostra em (A) Seções de fígado representativas coradas com H & E. (B) Pontuação da esteatose hepática média. (C) Triglicerídeos do fígado (mg / g de proteína). (D) Peso do fígado (g). Os dados são expressos como médias \pm SEM. (A-B) n = 4 e (C-D) n = 8. As diferenças significativas são indicadas por * p <0,05, ** p <0,01 ou *** p <0,001 para dietas obesogênicas versus controle e # p <0,05, # # p <0,01 ou ### p <0,001 para comparação entre dietas obesogênicas (ANOVA seguida de Tukey, exceto a esteatose hepática para a qual um teste de Qui-quadrado foi aplicado).

[0044] A figura 3 mostra em (A) TNF-a do soro expresso em pg/mL. (B) IL-10 sérica expressa em pg / mL. (C) Estado inflamatório medido como uma relação sérica de TNF- α / IL-10. (D) IL-6 sérica expressa em pg / mL. (E) Leptina de jejum no soro expressa em ng / mL. (F) adiponectina de jejum sérico expressada em μ g / mL. (G) O equilíbrio entre as adipocinas de efeitos opostos

foi medido pela proporção de leptina / adiponectina. (H) Glicemia de jejum sérico expresso em mg / dL. (I) insulina de jejum sérico expressada em $\mu\text{g} / \text{L}$. (J) Resistência à insulina medida pela avaliação do modelo homeostático do índice de resistência à insulina (HOMA-IR). (K) Avaliação dos produtos finais de glicação avançada do soro avaliados pelos níveis de N-carboximetilissina (% do controle). Os dados são expressos como médias \pm SEM. (A-K) n = 8-12. As diferenças significativas são indicadas por * p <0,05, ** p <0,01 ou *** p <0,001 para dietas obesogênicas versus controle, e # p <0,05, ## p <0,01, ou ### p <0,001 para comparação entre dietas obesogênicas (ANOVA seguida de Tukey, exceto a distribuição não-paramétrica de dados de IL-10, que utilizou o teste de Kruskal-Wallis).

Descrição Detalhada da Invenção

[0045] É um primeiro objeto da presente invenção, uma composição de dieta indutora de obesidade em ratos com altas quantidades de sal na sua composição e baixas quantidades de fibras.

[0046] Foram efetuados testes em ratos da linhagem Wistar, os quais consumiram a dieta por 18 semanas. A dieta WD se mostrou mais eficiente em induzir obesidade (Figura 1) do que outras duas dietas comumente utilizadas em estudos de obesidade, as quais são a dieta rica em lipídio (HFD – high fat diet) e a dieta de cafeteria (CAF).

[0047] Pode-se ver na Figura 1E que o acúmulo de gordura (WAT – white adipose tissue) foi quase o dobro no grupo de ratos que consumiu a WD em relação aos que consumiram a dieta controle. Na Figura 1D podemos ver que os animais que comeram as dietas HFD e CAF não engordaram (comparação com o controle).

[0048] Curiosamente, a dieta HFD e CAF, as quais induzem um acúmulo excessivo de gordura corporal na linhagem de camundongo C57, animal mais usado em estudos de obesidade induzida por dieta, não foram capazes de elevar o peso dos animais nem induzir o acúmulo excessivo de gordura

corporal em ratos da linhagem Wistar (Figura 1).

[0049] Outros estudos também mostram a ineficiência da HFD (uma das dietas mais utilizadas para induzir a obesidade) em induzir a obesidade em ratos da linhagem Wistar, o que aponta para a importância em encontrar dietas mais eficientes para induzir a obesidade nesta linhagem.

[0050] Em resumo, a Figura 1 traz um resultado muito importante uma vez que o ganho de peso é um fator determinante neste modelo ao mostrar que a dieta da presente invenção, representada pela sigla “WD” no gráfico, foi a mais eficaz na promoção da obesidade.

[0051] O acúmulo excessivo de gordura no fígado (esteatose hepática) é frequentemente visto em pessoas obesas, assim um bom modelo de obesidade deveria induzir esteatose.

[0052] Na Figura 2 podemos ver um maior aumento de gordura (triglicerídeos) no fígado, bem como um aumento no peso deste órgão nos animais que consumiram a CAF e a WD. Em outras palavras, cafeteria (CAF) e dieta ocidental (WD) induziram esteatose hepática mais pronunciada do que dieta com alto teor de gordura (HFD).

[0053] A inflamação crônica, resistência à insulina e desregulação hormonal da leptina são características negativas (geralmente associadas ao desenvolvimento de doenças) frequentemente presente em indivíduos obesos e que deveriam estar presentes nos modelos de obesidade induzidos por dieta.

[0054] Conclui-se da figura 3 que a dieta ocidental (WD) levou a um aumento nos níveis séricos de citocina pró-inflamatória (TNF- α) e foi a única dieta que induziu a resistência à insulina e aumentou a proporção de leptina / adiponectina.

[0055] Na Figura 3A podemos ver que os animais que consumiram a dieta WD apresentam quase o dobro de TNF- α no soro (marcador inflamatório) em relação a dieta controle e a CAF. Na Figura 3E podemos ver que os níveis de leptina são o dobro ou mais que o dobro nos animais que comeram a WD do que nas demais dietas, mostrando uma desregulação hormonal, a qual não

existe nas outras duas dietas. Na Figura 3J podemos ver através do HOMA (índice de resistência à insulina) que os animais que consumiram a WD apresentaram aproximadamente 3 vezes mais resistência à insulina do que as demais dietas.

[0056] Levando em conta esses resultados pode-se concluir que a HFD e a CAF não foram capazes de induzir a obesidade (bem como disfunções importantes para o modelo) em ratos da linhagem Wistar, a qual é bastante utilizada em estudos científicos. A WD representa o melhor modelo de obesidade induzida por dieta.

[0057] Esta nova dieta possui diversas vantagens como a alta eficiência em induzir obesidade, alta eficiência em induzir disfunções associadas à obesidade, alta palatabilidade, alta similaridade com a dieta ocidental humana, alta reprodutibilidade, adequada nutricionalmente e sem aditivos alimentares.

Exemplos - Concretizações

[0058] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

Exemplo I – Preparação da Dieta

[0059] Todos os ingredientes presentes na Tabela 1 foram pesados e adicionados a um recipiente. Junto a estes ingredientes se adiciona 200 ml de água para cada Kg (a água ajuda a dar liga ao produto). A partir daí se mistura a massa com as mãos até que a mesma fique homogênea. Após isso se modela a massa em formato cilíndrico de 5 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro (pellets). Os pellets são o produto final, os quais são fornecidos aos animais. O método industrial de ser feito é através de uma peleteira (máquina que faz pellets). Nesse caso se adiciona todos os ingredientes a um compartimento desta máquina e a mesma se encarrega de homogeneizar e fazer os pellets. Quando é feito a partir de uma peleteira a adição de água pode

ser dispensável, pois a máquina tem força o suficiente para formar os pellets a partir dos insumos iniciais (sem precisar dar a liga com a água).

Table 1: Composição da dieta

	Componentes da dieta	Dieta ocidental (g/Kg alimento)
Proteína	Proteína de soja	200
	Total	200
Lípidios	Banha de porco	180
	Óleo de soja	40
	Total	220
Carboidratos	Amido de milho	170
	Sacarose	300
	Total	470
Outros componentes	Sal	20 ^a
	Fibra	25 ^b
	Mix de vitamina	10
	Mix de Mineral	40
	Colina ^c	2
	Metionina	3
	Lisina	3
	Colesterol (mg)	0.169 ^d
Total (g)	989	

^aA quantidade de sal foi aumentada em nossa dieta ocidental para atingir uma concentração próxima da dieta ocidental humana.

^bA fibra foi dividida pela metade em nossa Dieta Ocidental porque, de acordo com Cordain et al. (2005), o conteúdo de fibra ingerida nos Estados Unidos é metade da recomendada.

^cAdicionou-se Colina na forma de cloreto de colina (52% de pureza).

^dEste colesterol vem da banha adicionada às dietas, levando em conta que 100 g de banha de porco tem 94 mg de colesterol (não foi adicionado colesterol puro).

[0060] A fonte de fibras utilizada na composição da presente invenção é a celulose.

[0061] Dois produtos dessa dieta podem ser substituídos. São eles: a fonte de proteínas e mix de minerais.

[0062] A proteína isolada de soja pode ser substituída por caseína.

[0063] O mix de minerais tem duas versões (tabela 2): AIN-93G-MX (que é para animais em fase de crescimento) e a AIN-93M-MX (que é uma dieta de manutenção para animais que já chegaram ao seu tamanho final adulto) (Reeves P. G., 1997).

Tabela 2. Misturas de minerais que fornecem as concentrações recomendadas de minerais para as dietas AIN-93G e AIN-93M (Reeves P. G., 1997)

Ingredientes	AIN – 93G - MX	AIN – 93M - MX
g ou mg/kg mix		
Carbonato de cálcio anidro	357,00	357,00
Fosfato monobásico de potássio	196,00	250,00
Citrato de potássio, tripotássio monohidratado	70,78	28,00
Cloreto de sódio	74,00	74,00
Sulfeto de sódio	46,00	46,00
Oxido de magnésio	24,00	24,00
Citrato de ferro	6,06	6,06
Carbonato de zinco	1,65	1,65
Meta-silicato de sódio	1,45	1,45
Carbonato de manganês	0,63	0,63
Carbonato de cobre	0,30	0,30
Sulfato de cromo (III) e potássio	0,275	0,275
Ácido bórico (mg)	81,5	81,5
Fluoreto de sódio (mg)	63,5	63,5
Carbonato de níquel (mg)	31,8	31,8
Cloreto de lítio (mg)	17,4	17,4
Selenato de sódio anidro (mg)	10,25	10,25
Iodeto de potássio (mg)	10,0	10,0
Molibdato de amônia (mg)	7,95	7,95
Vanadato de amonia (mg)	6,6	6,6
Sacarose em pó	221,026	209,806

[0064] A tabela 3 apresenta os ingredientes e a quantidade em gramas dos sais usados na produção da dieta animal indutora de obesidade utilizados na presente invenção.

Tabela 3. Ingredientes de uma versão da dieta simplificada.

Sais	gramas
KH ₂ PO ₄ (fosfato monobásico de potássio)	389
CaCO ₃ (carbonato de cálcio)	381,4
NaCl (cloreto de sódio)	139,3
MgSO ₄ 7 H ₂ O (sulfato de magnésio heptahidratado)	117,2
FeSO ₄ 7H ₂ O (sulfato ferroso II heptahidratado)	27
MnSO ₄ H ₂ O (sulfato de manganês)	4
ZnSO ₄ 7H ₂ O (sulfato de zinco heptahidratado)	0,548
CuSO ₄ 5H ₂ O (sulfato de cobre pentahidratado)	0,477
CoCl ₂ 6H ₂ O (cloreto de cobalto II hexahidratado)	0,023
KI (iodeto de potássio)	0,79

[0065] Não há mais de uma versão para a composição deste mix de vitaminas, a composição do mix de vitaminas está apresentada na Tabela 4.

[0066] Tabela 4 - Mistura de vitamina AIN-93-VX recomendada para uso com as formulações de dieta AIN-93G e AIN-93M (Reeves P. G., 1997).

Vitamina	Quantidade
g/kg mistura	
Ácido nicotínico	3,000
Ca pantotenato	1,600
Piridoxina-HCl	0,700
Tiamina-HCl	0,600
Riboflavina	0,600
ácido fólico	0,200
biotina	0,020
Vitamina B-12	2,500
Vitamina E	15,000
Vitamina A	0,800
Vitamina D-3	0,250
Vitamina K-1	0,075
Sacarose em pó	974,655

[0067] A composição da nova dieta (Tabela 1) foi desenvolvida com base em trabalhos que reportam o consumo atual médio de nutrientes de uma dieta ocidental seguido por algumas modificações. Com relação a uma dieta padrão para ratos, esta nova dieta apresenta maior quantidade de gordura, açúcar, sal e uma diminuição das fibras.

[0068] Apesar de ter valores fixos desses nutrientes na Tabela 1, uma variação na quantidade desses nutrientes muito provavelmente irá produzir uma dieta igualmente eficiente.

[0069] A quantidade de gordura que possivelmente é tão eficiente quanto ou

melhor do que a apresentada na tabela varia de 175 a 300 g por Kg de ração, a de açúcar varia de 200 a 400 g por Kg de ração, a de sal varia de 16 a 25 g por Kg de ração e a quantidade de fibras varia de 20 a 40 g por Kg de ração.

[0070] Autores têm usado dietas que aumentam a quantidade de lipídeos e de sacarose, pois estes macronutrientes já são descritos como indutores de obesidade. Porém, em relação as dietas já existentes na literatura esta nova dieta apresenta um aumento na quantidade de sal e uma diminuição na quantidade de fibras, as quais são as novidades desta dieta.

[0071] O sal é relevante para aumentar a palatabilidade da dieta, a qual está associada à hiperfagia que por sua vez está associada à obesidade. As fibras por sua vez são relacionadas a redução de peso e a observada redução de fibras na população pode estar por trás da crescente epidemia de obesidade. Além disso, estes dois nutrientes foram alterados na dieta baseado no consumo humano destes nutrientes, assim tornando ela mais similar a dieta ocidental humana.

Usos e aplicações

[0072] Existem muitas empresas que produzem rações animais para serem usadas na pesquisa. Estas empresas se especializam em produzir e comercializar dietas específicas voltadas diretamente para centros de pesquisa.

[0073] Dentre estas dietas as indutoras de obesidade são as mais comuns. Existe uma diversidade de rações que são usadas para indução de obesidade. A dieta proposta é uma dieta mais eficiente em induzir a obesidade em ratos da linhagem Wistar em comparação com os produtos e alternativas propostas atualmente no mercado, portanto, essa dieta se apresenta com um alto potencial de comercialização.

[0074] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

1. Composição indutora de obesidade em ratos **caracterizada por** compreender

- uma fonte de proteína selecionada a partir do grupo consistindo de: proteína de soja, caseína, ou combinações das mesmas;

- uma fonte de lipídeos selecionada a partir do grupo consistindo de: banha de porco, óleo de soja ou combinações dos mesmos;

- uma fonte de carboidratos selecionada a partir do grupo consistindo de: amido de milho, sacarose ou combinações dos mesmos;

- uma fonte de fibras selecionada a partir do grupo consistindo de: celulose;

- um mix de vitaminas selecionado a partir do grupo consistindo de: Ácido nicotínico, Ca pantotenato, Piridoxina-HCl, Tiamina-HCl, Riboflavina, ácido fólico, biotina, Vitamina B-12, Vitamina E, Vitamina A, Vitamina D-3, Vitamina K-1, Sacarose em pó todos combinados;

- um mix de minerais selecionado a partir do grupo consistindo de: KH_2PO_4 (fosfato monobásico de potássio), CaCO_3 (carbonato de cálcio), NaCl (cloreto de sódio), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (sulfato de magnésio heptahidratado), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato ferroso II heptahidratado), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (sulfato de manganês), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de zinco heptahidratado), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobre pentahidratado), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (cloreto de cobalto II hexahidratado), KI (iodeto de potássio) todos combinados;

- NaCl;

- cloreto de colina;

- metionina; e

- lisina.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** estar na forma sólida.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** compreender de 16 a 25 g de NaCl, 20 a 40 g da fonte de fibras, 175 a 300 g

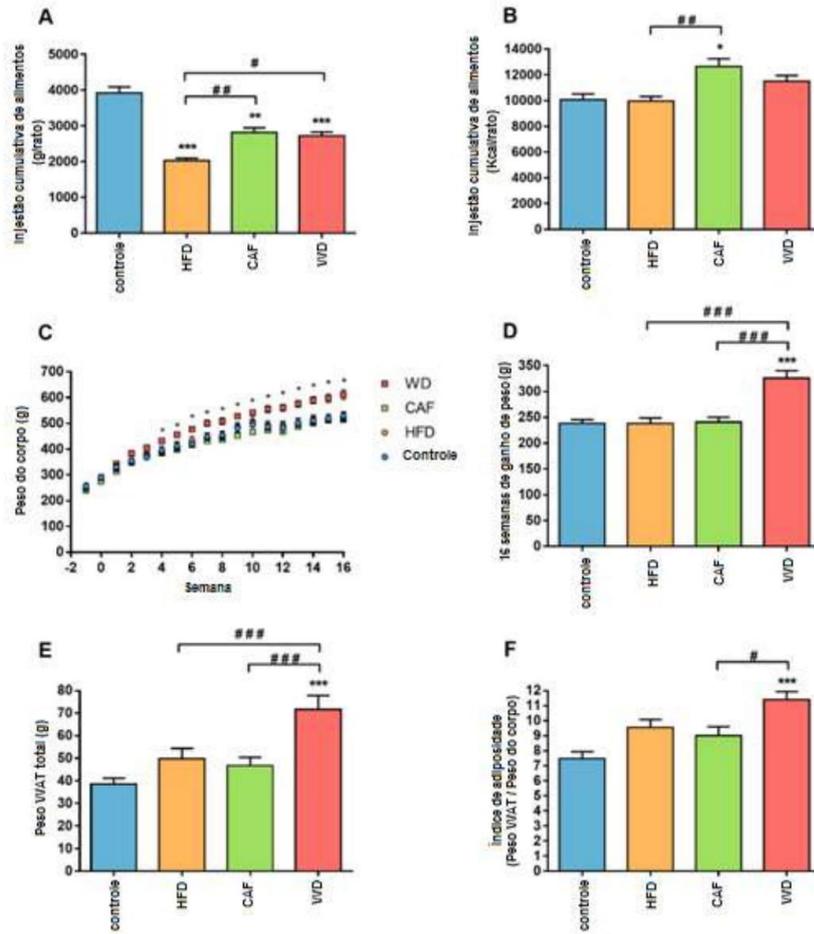
da fonte de lipídeos, 200 a 400 g da fonte de sacarose, sendo que todas essas medidas são por Kg de ração.

4. Uso da composição, conforme definida na reivindicação 1, **caracterizado** por ser para o preparo de uma composição para indução do aumento de peso em ratos.

Resumo

COMPOSIÇÃO INDUTORA DE OBESIDADE EM RATOS E USO DA
COMPOSIÇÃO PARA O PREPARO DE UMA COMPOSIÇÃO PARA INDUZIR
OBESIDADE EM RATOS

A presente invenção descreve uma composição alimentícia para dieta indutora de obesidade útil para estudos de obesidade em animais de laboratório principalmente ratos da linhagem Wistar. A presente invenção se situa nos campos da Medicina e Nutrição.



FIGURAS

Figura 1

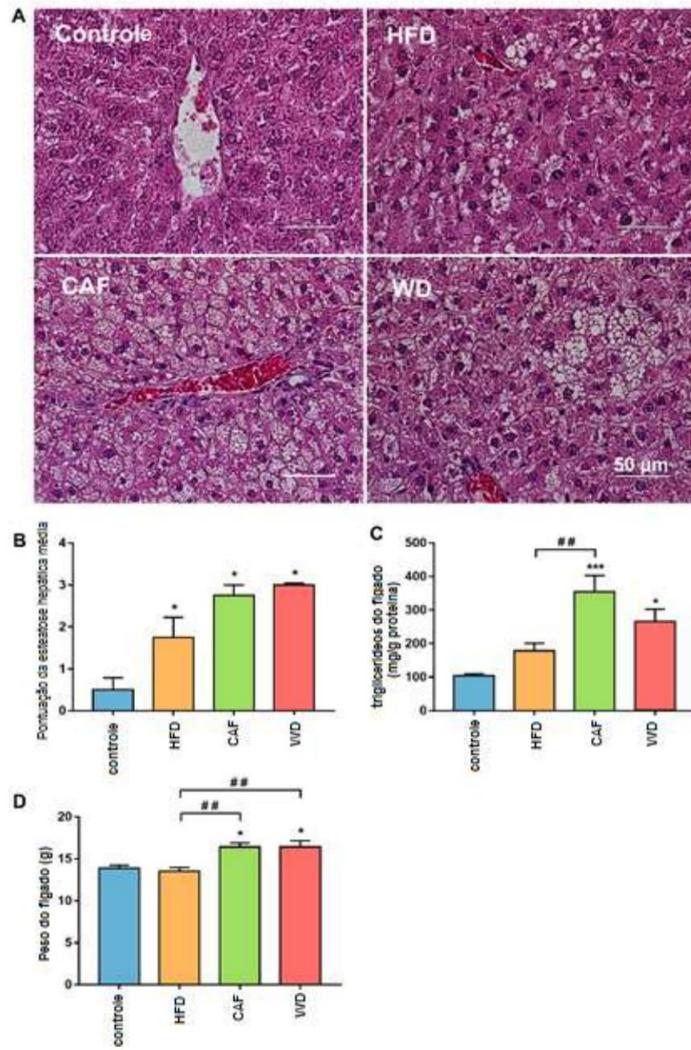


Figura 2

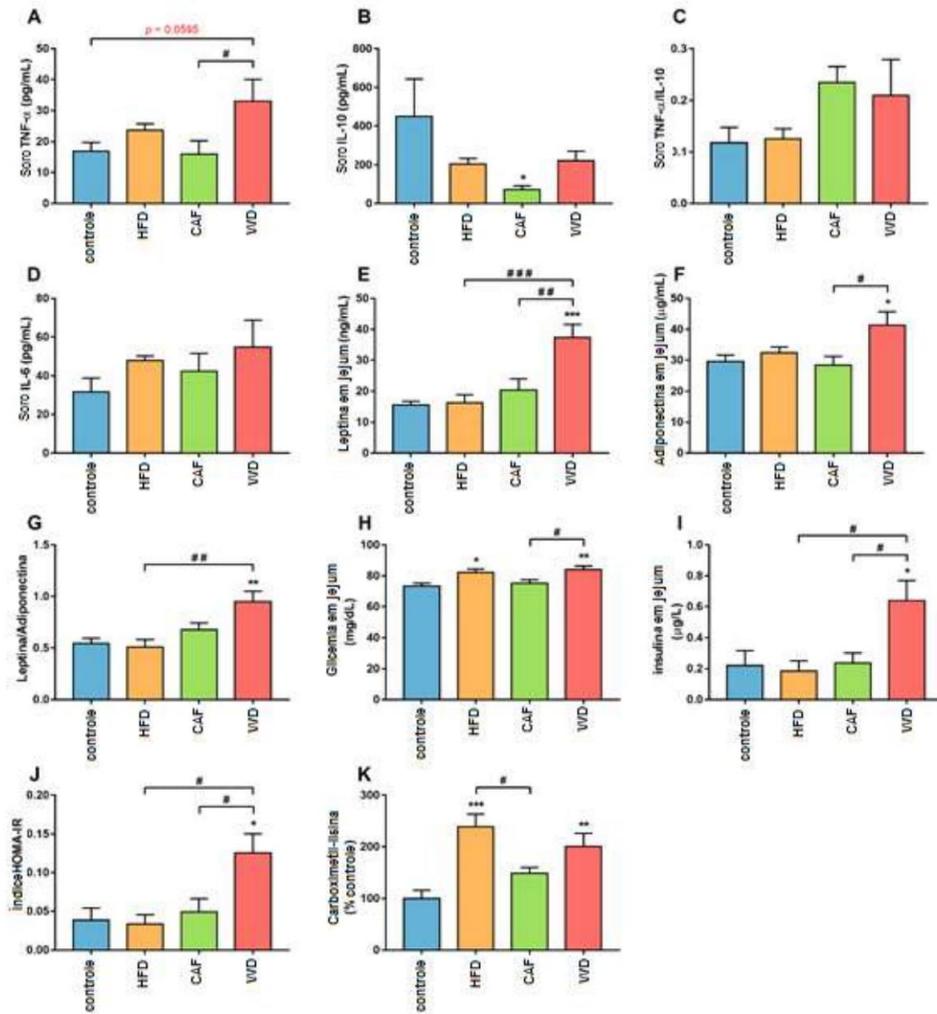


Figura 3

Original Article

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

R C Bortolin , A R
Vargas [...] J C F Moreira

*International Journal of
Obesity*

doi:10.1038/ijo.2017.225

[Download Citation](#)

[Bacteria Biochemistry](#)

[Metabolic syndrome Obesity](#)

Received: 10 May 2017

Revised: 01 September 2017

Accepted: 04 September 2017

Published online: 12
September 2017

Abstract

Background/Objectives:

Obesity is a metabolic disorder that predisposes patients to numerous diseases and has become a major global public-health concern. Animal models of diet-

induced obesity (DIO) are frequently used to study obesity, but which DIO model most accurately reflects the pathology of human obesity remains unclear. In this study, we designed a diet based on the human Western diet (WD) and compared it with the cafeteria diet (CAF) and high-fat diet (HFD) in order to evaluate which diet most closely mirrors human obesity.

Methods:

Wistar rats were fed four different diets (WD, CAF, HFD and a low-fat diet) for 18 weeks. Metabolic parameters and gut microbiota changes were then characterized.

Results:

Rats fed the four different diets exhibited completely different phenotypes, highlighting the importance of diet selection. This study also revealed that WD most effectively induced obesity and obesity-related disorders, and thus proved to be a robust model of human obesity. Moreover, WD-fed rats developed obesity and obesity-related comorbidities independent of major alterations in gut microbiota composition (dysbiosis), whereas CAF-fed rats developed the greatest dysbiosis independent of obesity. We also characterized gut microbiota after feeding on these four different diets and identified five genera that might be involved in the pathogenesis of obesity.

Conclusions:

These data suggest that diet, and not the obese state, was the major driving force behind gut microbiota changes. Moreover, the marked dysbiosis observed in CAF-fed rats might have resulted from the presence of several additives present in the CAF diet, or even a lack of essential vitamins and minerals. Based on our findings, we recommend the use of the prototypic WD (designed here) in DIO models. Conversely, CAF could be used to investigate the effects of excessive consumption of industrially produced and highly processed foods, which are characteristic of Western society.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

PORTARIA Nº 7906 de 05/10/2016

Delegação de competência ao Secretário de Desenvolvimento Tecnológico.

O REITOR DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, no uso de suas atribuições e tendo em vista o disposto nos artigos 11 e 12 do Decreto-Lei nº 200, de 25 de fevereiro de 1967, regulamentado pelo Decreto nº 62.460, de 25 de março de 1968,

RESOLVE:

Artigo 1º - Delegar competência ao Professor **JOSÉ LUIS DUARTE RIBEIRO**, Secretário de Desenvolvimento Tecnológico, para, a partir de 30 de setembro de 2016 e sem prejuízo das atribuições que regimentalmente competem ao titular do mesmo cargo, praticar os atos administrativos a seguir enumerados:

1. Solicitação de registro da propriedade intelectual, junto aos órgãos competentes do país e do exterior, bem como instrumentos de licenciamento de tecnologia, sem exclusividade, a seguir relacionados:

- 1.1 - registro de patente (patentes de invenção, modelos de utilidade, desenho industrial, etc.);
- 1.2 - certificado de adição;
- 1.3 - registro de marca;
- 1.4 - transferência de titularidade;
- 1.5 - registro de software;
- 1.6 - registro e proteção de cultivares;
- 1.7 - petições para pagamento de anuidade, atendimento de exigências, exames de patentes, etc;
- 1.8 - demais documentos que tenham por objetivo solicitar registro de propriedade intelectual da UFRGS;
- 1.9 - contratos de licenciamento de propriedade intelectual da UFRGS, na forma não exclusiva para o licenciante, com prévia análise da Procuradoria Geral da UFRGS.

2. Instrumentos legais firmados com parceiros externos, que não envolvem recursos financeiros, apenas resguardam direitos de propriedade intelectual da instituição.

- 2.1 - contratos de Co-Titularidade - Estes instrumentos legais são Firmados com o objetivo de estabelecer os percentuais de co-titularidade e as obrigações de cada uma das partes, com relação ao uso e manutenção dos direitos de propriedade intelectual sobre uma tecnologia;

2.2 - acordos de Confidencialidade - Os Acordos de Confidencialidade têm por objetivo proteger a tecnologia, desenvolvida pelos pesquisadores da UFRGS, com vistas a possibilitar seu emprego no processo produtivo econômico por parte de algum parceiro externo;

2.3 - acordos de Transferência de Material Biológico - Estes Acordos visam assegurar os direitos das partes sobre os materiais biológicos de sua propriedade, na transferência, para fins de pesquisa, para uma instituição parceira.

3. Firmar documentos, na esfera de competência da Secretaria de Desenvolvimento Tecnológico - SEDETEC, com parceiros externos onde não ocorram repasse de recursos financeiros, nem envolvam despesas para as partes.

3.1 - contratos onde, no objeto, estejam previstas atividades de P&D, com prévia análise legal pela Procuradoria Geral da UFRGS;

3.2 - termos de compromisso.

4. Firmar documentos onde exista repasse de recursos do exterior, voltados para P&D, mas que não gerem obrigações financeiras para a Instituição.

4.1 - auxílio de países desenvolvidos;

4.2 - doações oriundas do exterior;

4.3 - recursos de fundos perdidos.

Parágrafo único: A administração financeira destes recursos, ficará a cargo da PROPLAN/UFRGS.

Artigo 2º - As assinaturas de convênios não estão incluídas na delegação de competência constante no artigo anterior, permanecendo com a tramitação atual e firmada pelo Reitor.

Artigo 3º - A autoridade a que se refere o artigo 1º da presente Portaria, considerando a necessidade do serviço, poderá subdelegar os poderes que, por este ato, lhe são delegados.

Artigo 4º - Revogam-se as disposições em contrário.

RUI VICENTE OPPERMANN,
Reitor.



DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO

República Federativa do Brasil - Imprensa Nacional

Em circulação desde 1º de outubro de 1862

Ano LVII N° 182

Brasília - DF, quarta-feira, 21 de setembro de 2016



SEÇÃO

2

Sumário

	PÁGINA
Atos do Poder Executivo.....	1
Presidência da República.....	2
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.....	3
Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.....	5
Ministério da Cultura.....	5
Ministério da Defesa.....	6
Ministério da Educação.....	9
Ministério da Fazenda.....	30
Ministério da Integração Nacional.....	34
Ministério da Justiça e Cidadania.....	35
Ministério da Saúde.....	36
Ministério das Relações Exteriores.....	40
Ministério de Minas e Energia.....	40
Ministério do Desenvolvimento Social e Agrário.....	41
Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços.....	42
Ministério do Esporte.....	43
Ministério do Meio Ambiente.....	43
Ministério do Planejamento, Desenvolvimento e Gestão.....	44
Ministério do Trabalho.....	45
Ministério do Turismo.....	46
Ministério dos Transportes, Portos e Aviação Civil.....	46
Conselho Nacional do Ministério Público.....	47
Ministério Público da União.....	47
Poder Legislativo.....	50
Poder Judiciário.....	50
Entidades de Fiscalização do Exercício das Profissões Liberais.....	55
Editais e Avisos.....	55

Atos do Poder Executivo

ADVOCACIA-GERAL DA UNIÃO

DECRETO DE 20 DE SETEMBRO DE 2016

O PRESIDENTE DA CÂMARA DOS DEPUTADOS, no exercício do cargo de PRESIDENTE DA REPÚBLICA, no uso de suas atribuições e tendo em vista o disposto no § 2º do art. 3º da Lei Complementar nº 73, de 10 de fevereiro de 1993, resolve

TABELA DE PREÇOS DE JORNALS AVULSOS

Páginas	Distrito Federal	Demais Estados
de 02 a 28	R\$ 0,30	R\$ 1,80
de 32 a 76	R\$ 0,50	R\$ 2,00
de 80 a 156	R\$ 1,10	R\$ 2,60
de 160 a 250	R\$ 1,50	R\$ 3,00
de 254 a 500	R\$ 3,00	R\$ 4,50

- Acima de 500 páginas = preço de tabela mais excedente de páginas multiplicado por R\$ 0,0107

Este documento pode ser verificado no endereço eletrônico <http://www.in.gov.br/autenticador.html>,
Petição 870-18/2016 de 002/2016/0031/0001/1/31

DESIGNAR

PAULO GUSTAVO MEDEIROS CARVALHO, para exercer o encargo de substituto eventual do Advogado-Geral da União, durante os afastamentos legais e regulamentares do titular, ficando dispensado o seu atual detentor.

Brasília, 20 de setembro de 2016; 195º da Independência e 128ª da República.

RODRIGO MAIA
Grace Maria Fernandes Mendonça

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

DECRETO DE 20 DE SETEMBRO DE 2016

O PRESIDENTE DA CÂMARA DOS DEPUTADOS, no exercício do cargo de PRESIDENTE DA REPÚBLICA, no uso da atribuição que lhe confere o art. 84, caput, inciso XXV, da Constituição, e tendo em vista o disposto no art. 16, caput, inciso I, da Lei nº 5.540, de 28 de novembro de 1968, resolve

NOMEAR

RUI VICENTE OPPERMANN, Professor da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para exercer o cargo de Reitor da referida Universidade, com mandato de quatro anos.

Brasília, 20 de setembro de 2016; 195º da Independência e 128ª da República.

RODRIGO MAIA
José Mendonça Bezerra Filho

MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO, DESENVOLVIMENTO E GESTÃO

DECRETOS DE 20 DE SETEMBRO DE 2016

O PRESIDENTE DA CÂMARA DOS DEPUTADOS, no exercício do cargo de PRESIDENTE DA REPÚBLICA, no uso da atribuição que lhe confere o art. 84, caput, inciso XXV, da Constituição, e tendo em vista o disposto no art. 11 do Estatuto do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social - BNDES, aprovado pelo Decreto nº 4.418, de 11 de outubro de 2002, resolve

EXONERAR

JOSÉ CONSTANTINO DE BASTOS JUNIOR da função de membro do Conselho de Administração do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social - BNDES.

Brasília, 20 de setembro de 2016; 195º da Independência e 128ª da República.

RODRIGO MAIA
Dyogo Henrique de Oliveira

O PRESIDENTE DA CÂMARA DOS DEPUTADOS, no exercício do cargo de PRESIDENTE DA REPÚBLICA, no uso da atribuição que lhe confere o art. 84, caput, inciso XXV, da Constituição, e tendo em vista o disposto no art. 21 do Estatuto do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social - BNDES, aprovado pelo Decreto nº 4.418, de 11 de outubro de 2002, resolve

EXONERAR

MARCO ANTÔNIO DE OLIVEIRA da função de membro efetivo do Conselho Fiscal do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social - BNDES.

Brasília, 20 de setembro de 2016; 195º da Independência e 128ª da República.

RODRIGO MAIA
Dyogo Henrique de Oliveira

O PRESIDENTE DA CÂMARA DOS DEPUTADOS, no exercício do cargo de PRESIDENTE DA REPÚBLICA, no uso da atribuição que lhe confere o art. 84, caput, inciso XXV, da Constituição, e tendo em vista o disposto no art. 11 do Estatuto do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social - BNDES, aprovado pelo Decreto nº 4.418, de 11 de outubro de 2002, resolve

NOMEAR

NATÁLIA MARCASSA DE SOUZA, para exercer a função de membro do Conselho de Administração do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social - BNDES.

Brasília, 20 de setembro de 2016; 195º da Independência e 128ª da República.

RODRIGO MAIA
Dyogo Henrique de Oliveira

O PRESIDENTE DA CÂMARA DOS DEPUTADOS, no exercício do cargo de PRESIDENTE DA REPÚBLICA, no uso da atribuição que lhe confere o art. 84, caput, inciso XXV, da Constituição, e tendo em vista o disposto no art. 21 do Estatuto do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social - BNDES, aprovado pelo Decreto nº 4.418, de 11 de outubro de 2002, resolve

NOMEAR

CHRISTIANNE DIAS FERREIRA, para exercer a função de membro efetivo do Conselho Fiscal do Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social - BNDES.

Brasília, 20 de setembro de 2016; 195º da Independência e 128ª da República.

RODRIGO MAIA
Dyogo Henrique de Oliveira

TRIBUNAL DE CONTAS DA UNIÃO

DECRETO DE 20 DE SETEMBRO DE 2016

O PRESIDENTE DA CÂMARA DOS DEPUTADOS, no exercício do cargo de PRESIDENTE DA REPÚBLICA, no uso da atribuição que lhe confere o art. 84, caput, inciso XXV, da Constituição, tendo em vista o disposto no art. 80, caput e § 3º, da Lei nº 8.443, de 16 de julho de 1992, e de acordo com o que consta do Processo nº 08001.004719/2016-97 do Ministério da Justiça e Cidadania, resolve

NOMEAR

RODRIGO MEDEIROS DE LIMA, para exercer o cargo de Procurador da Carreira do Ministério Público junto ao Tribunal de Contas da União, em virtude de aprovação em concurso público homologado pelo Edital nº 13, de 29 de julho de 2016, publicado no Diário Oficial da União de 1º de agosto de 2016, Seção 3, página 150.

Brasília, 20 de setembro de 2016; 195º da Independência e 128ª da República.

RODRIGO MAIA
José Levi Mello do Amaral Júnior

TRIBUNAL SUPERIOR DO TRABALHO

DECRETO DE 20 DE SETEMBRO DE 2016

O PRESIDENTE DA CÂMARA DOS DEPUTADOS, no exercício do cargo de PRESIDENTE DA REPÚBLICA, no uso da atribuição que lhe conferem o art. 84, caput, inciso XVI, e o art. 115, caput, inciso I, da Constituição, tendo em vista o disposto no art. 6º da Emenda Constitucional nº 41, de 19 de dezembro de 2003, e de acordo com o que consta do Processo nº 08000.031315/2016-86 do Ministério da Justiça e Cidadania, resolve

Documento assinado digitalmente conforme MP nº 2.200-2 de 24/08/2001, que institui a Infraestrutura de Chaves Públicas Brasileira - ICP-Brasil.

Capítulo III

Artigo submetido

Anti-obesity mechanisms of guarana in a diet-induced obesity model: perspectives on gut microbiota and brown adipose tissue activation

Artigo submetido à *International Journal of Obesity* em dezembro de 2017

1 Anti-obesity mechanisms of guarana in a diet-induced obesity model: perspectives on gut microbiota and
2 brown adipose tissue activation

3

4 **Running title:** Guarana as a safe anti-obesity therapeutic agent

5 Rafael Calixto Bortolin^{1,2}, Amanda Rodrigues Vargas¹, Vitor de Miranda Ramos¹, Juciano Gasparotto¹,
6 Paloma Rodrigues Chaves¹, Carlos Eduardo Schnorr¹, Katia da Boit Martinello², Alexandre Kleber
7 Silveira¹, Henrique Mautone¹, Thallita Kelly Rabelo⁴, Marcelo Sartori Grunwald¹, Rodrigo Ligabue-
8 Braun³, Daniel Pens Gelain¹, and José Cláudio Fonseca Moreira¹

9

10 ¹Centro de Estudos em Estresse Oxidativo - Departamento de Bioquímica – Instituto de Ciências Básicas
11 da Saúde - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Ramiro Barcelos, 2600 –
12 Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

13 ²Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental – Universidad de la Costa, Calle 58 #55-66, CP 080002,
14 Barranquilla, Atlántico, Colombia.

15 ³Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular - Centro de Biotecnologia (CBiot) -
16 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves 9500, Prédio 43431,
17 CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

18 ⁴Departamento de Educação em Saúde – Campus Universitário Professor Antônio Garcia Filho –
19 Universidade Federal de Sergipe (UFS), Avenida Governador Marcelo Déda, 13 - CEP 49400-000,
20 Lagarto, SE, Brasil.

21

22 **Corresponding author:**

23 Rafael Calixto Bortolin

24 e-mail: rafaelbortolin@hotmail.com

25 Phone: +55 51 33085578

26 Fax: +55 51 33085540

27

28 **Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

29 **Support:** Funding for this project was provided by the Brazilian funding agencies CNPq (402471/2013-
30 0), CAPES, FAPERGS (PRONEX 16/2551-0000 499-4), PROPESQ-UFRGS and FIPE (150542).

31 **Abstract**

32 **Background/Objectives:** The adverse health consequences of being obese/overfat and the alarming
33 number of people with these conditions, as well as the search for a global beauty standard, have led to the
34 uncontrolled pursuit of weight loss. This has encouraged many people to utilize nonprescription herbal
35 weight-loss supplements without knowledge of their safety or efficacy. Many studies have shown the
36 anti-obesity potential of several natural herbs. However, mounting evidence has shown that some herbal
37 supplements used for weight loss are associated with adverse effects. Guarana seed powder is a popular
38 nonprescription dietary herb supplement marketed for weight loss, but no study has demonstrated its
39 efficacy or safety when administered alone. **Methods:** Wistar rats were fed four different diets (low-fat
40 diet and Western diet (WD) with or without guarana supplementation) for 18 weeks. Metabolic
41 parameters, gut microbiota changes, and toxicity were then characterized. Molecular docking was
42 performed to verify possible binding of guarana compounds with the activation site of AMP-activated
43 protein kinase (AMPK). **Results:** Guarana seed powder supplementation prevented weight gain, insulin
44 resistance, and adipokine dysregulation induced by WD compared to the control diet. Guarana induced
45 brown adipose tissue (BAT) expansion, mitochondrial biogenesis, uncoupling protein-1 overexpression,
46 AMPK activation, and minor changes in gut microbiota. Molecular docking suggested a direct activation
47 of AMPK by four guarana compounds tested here. The dose and form of administration used here did not
48 induce any toxic effects. We estimated the safe human-equivalent dose to be used in future clinical trials.

49 **Conclusions:** We propose that BAT activation is one of the action mechanisms involved in guarana
50 supplementation-induced weight loss and that direct AMPK activation may underlie this mechanism. In
51 summary, guarana is an attractive potential therapeutic agent to treat obesity.

52

53 **Keywords:** *Paullinia cupana*, AMPK, UCP1, western diet, gut microbiota.

54

55 **INTRODUCTION**

56 Obesity is a metabolic disorder associated with adverse health consequences that has increased worldwide
57 at an epidemic rate¹. Currently, over 90% of adults in the US, New Zealand, Greece, and Iceland are
58 estimated to be overfat, a new term that refers to an accumulation of excess body fat that becomes
59 sufficient to impair health^{2,3}. Indeed, being overfat shares direct links to cardiovascular disease, stroke,
60 type 2 diabetes (T2D), cancer, gallbladder disease, osteoarthritis, pulmonary diseases, and sleep apnea³.
61 These alarming numbers and adverse health consequences of being obese/overfat, as well as the desire to
62 achieve accepted global beauty standards, has led people to take nonprescription herbal weight-loss
63 supplements without knowing their safety or efficacy^{4,5}. Many studies have shown the anti-obesity
64 potential of several natural herbs, such as green tea, green coffee, fenugreek, and pepper^{5,6}. However,
65 ample evidence has shown that some herbal supplements used for weight loss in the management of
66 obesity are associated with toxicity⁷⁻¹⁰. Many of these supplements are labeled as “natural,” a term that is
67 often misinterpreted as meaning “safe”⁴. This has been reflected in the scientific literature, where most of
68 the focus has centered on weight loss, while the toxicity and action mechanisms of many herbal extracts
69 remain unevaluated.

70

71 Guarana (*Paullinia cupana*) is a native plant from the Amazon, rich in catechins and methylxanthines.
72 Extracts from its roasted seeds have been used as stimulants, aphrodisiacs, tonics, and for weight loss^{10,11}.
73 Because of its aforementioned potential, it has been widely used as a constituent of medicinal/dietary
74 supplements^{7,10,12-14}. While some evidence suggests its potential in reducing weight^{12,15-17}, other studies
75 indicate possible adverse effects^{7,9,10,18}. It is worth noting that many adverse effects associated with
76 guarana are generally observed in mixtures where guarana is only one active ingredient, and the toxic
77 potential of guarana itself is unknown. In this regard, the effectiveness and toxicity of guarana seed
78 powder (GSP) needs to be further explored, preferably in the same study.

79

80 Anti-obesity mechanisms of plant extracts and isolated phytochemicals have been widely explored. These
81 mechanisms include appetite reduction, modulation of lipid absorption and metabolism, thermogenesis,
82 and changes in the gut microbiota⁵. Brown adipose tissue (BAT) is the major site of thermogenesis, which
83 is characterized by fat burning associated with heat production instead of ATP production, through a
84 process called uncoupled respiration mediated by uncoupling protein-1 (UCP1)^{19,20}. BAT activation

85 (increased thermogenesis) has gained much attention among anti-obesity therapies because recent studies
86 have suggested that substantial amounts of metabolically active BAT are present in humans^{5,19}, which
87 differs from what was previously believed. BAT expansion, UCP1 content, and mitochondrial numbers
88 are key factors that indicate BAT activation^{21,22} and, therefore, have been widely evaluated. Many plant
89 extracts and phytochemicals have been found to activate BAT²³⁻²⁶. Moreover, plant derivatives have been
90 found to activate AMP-activated protein kinase (AMPK)^{5,6,27}, another mechanism to enhance energy
91 expenditure. AMPK acts as an intracellular energy sensor, regulating energy status by increasing
92 catabolic processes to increase ATP production. Furthermore, AMPK activation may lead to BAT
93 activation by stimulating mitochondrial biogenesis^{5,28,29}.

94

95 Given that ~50% of pharmaceuticals are estimated, directly or indirectly, to be plant derivatives⁵,
96 knowing the effects of plant derivatives is essential for drug development. GSP is a popular non-
97 prescription dietary herb supplement for weight loss, but no study has shown its efficacy and safety when
98 administered alone. In addition, if guarana presents anti-obesity potential, its mechanism of action needs
99 to be clarified. Therefore, we assessed the effectiveness, possible mechanisms of action, and toxicity of
100 GSP in rats using a diet-induced obesity model.

101

102 **MATERIALS AND METHODS**

103 **Animals**

104 Male Wistar rats (8 weeks old) were obtained from our breeding colony. They were housed three
105 rats/cage with *ad libitum* access to water and standard commercial chow (Chow Nuvilab CR-1 type;
106 Curitiba, PR, Brazil). Rats were maintained on a 12 h light-dark cycle in a temperature-controlled colony
107 room (21°C) for two weeks before being randomly assigned to one of the four experimental diet groups
108 (acclimatization).

109

110 **Ethics statement**

111 All animal experiments were performed at the Departamento de Bioquímica of Universidade Federal do
112 Rio Grande do Sul (UFRGS) and were approved by the Ethical Committee on Animal Use (CEUA) of the
113 UFRGS (protocol number 27648). All experimental procedures were performed in accordance with the
114 Guide for Care and Use of Laboratory Animals³⁰.

115

116 **Guarana (*Paullinia cupana* Mart)**

117 We utilized a commercial GSP from Lifar (RS, Brazil) to supplement the rat diets. The bioactive
118 compounds of GSP were previously determined and quantified in our laboratory³¹: caffeine (34.19 ± 1.26
119 mg/g), theobromine (0.14 ± 0.01 mg/g), (+)-catechin (3.76 ± 0.12 mg/g), and (-)-epicatechin (4.05 ± 0.16
120 mg/g).

121

122 **Experimental design**

123 After the acclimatization period, 10-week-old rats (n = 12 per group) were maintained *ad libitum* for 18
124 weeks on either control diet (matched low-fat chow based on AIN-93³²), control diet supplemented with
125 0.5% (w/w) guarana (Control + Gua), Western diet (WD), or WD supplemented with 0.5% (w/w) guarana
126 (WD + Gua). Our previous study demonstrated that the WD produces a more realistic and robust model
127 of human obesity compared to the traditional high-fat diet (HFD) or cafeteria diet (CAF) in Wistar rats³³.
128 The WD is high in fat, simple carbohydrates, and salt, and low in fiber (Supplementary Table S1). Diets
129 were provided in pellet form and were replaced every two days. The kcal sources for each diet are
130 provided in Supplementary Table S2. The concentration of 0.5% guarana supplementation was obtained
131 by two different calculations taking into account the manufacturer's dosage recommendation (3 g for a 70

132 kg individual per day, *i.e.*, 42.85 mg/kg/day). When multiplied by a factor based on body surface area,
133 which is correlated with metabolic rate (6.2 times higher in rats than humans), we obtained a value of
134 265.67 mg/kg/day; which was reached when we supplement the diet with 0.5% guarana, taking into
135 account that the rats utilized in this study eat ~24 g per day and weigh ~450 g^{34,35}. Another calculation
136 considered that a 70 kg individual consumes ~600 g of food per day, so the 3 g per day recommended by
137 the manufacturer corresponds to 0.5% of the diet (food consumption is also correlated with metabolic
138 rate).

139

140 **Analysis**

141 The supplementary information (Supplementary Material and Methods) describes in detail the
142 methodologies related to material collection, body weight, food intake, adiposity index, lipid profile,
143 serum metabolites, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, liver oxidative damage markers,
144 serum cytokine and hormone levels, homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), N^ε-
145 carboxymethyllysine levels, mitochondrial copy number, protein immunoblot (immunoblots), DNA
146 extraction, sequencing analysis, molecular docking and behavioral tests. The exact sample size (n) for
147 each experimental group is shown in the Figure Legends.

148

149 **Statistics**

150 Analysis was performed using ANOVA followed by Tukey post-hoc tests (homogeneity of variance was
151 tested using Levene's test) for comparison between Control, WD, and WD + Gua groups. In the case of a
152 non-parametric distribution of data, the Kruskal-Wallis test was used. Differences in microbial
153 communities were assessed using ANOVA followed by Tukey-Kramer post-hoc tests. No blinding was
154 performed for data analysis. Samples were excluded when they were outliers. Data are shown as means ±
155 SEM. Significant differences are indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.001$. Results were
156 statistically evaluated using SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), and graphics were generated using
157 GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) and STAMP 2.1.3 software.

158

159 **RESULTS**

160 **Anti-obesity potential of guarana**

161 Given that clinical trials have shown the potential of several herbal supplement mixtures containing
162 guarana in reducing the weight of overweight patients^{12,15,16} and that an epidemiological study has
163 suggested an anti-obesity effect of guarana¹⁷, we addressed whether guarana alone is effective in reducing
164 weight. We first evaluated the impact of guarana on weight gain and fat accumulation. Guarana
165 supplementation to the WD decreased weight gain compared to WD (Figure 1A and B) and prevented
166 excessive fat accumulation (Figure 1C and D), supporting the aforementioned studies. Second, we
167 evaluated whether the observed weight decrease was due to lower energy consumption. Energy and food
168 intake were not significantly different between the WD- and WD + Gua-fed rats (Figure 1E and F),
169 demonstrating that the guarana added to diets did not induce a reduction in food intake. Taken together,
170 these results suggest an anti-obesity effect of guarana, which is independent of caloric intake.

171

172 **Protective effect of guarana against insulin resistance and adipokine deregulation**

173 We then asked whether guarana had any effect on common negative conditions associated with obesity,
174 such as insulin resistance, high serum triglycerides (TG), hepatic steatosis, adipokine deregulation, and
175 inflammation^{3,36}. Treatment of WD-fed rats with guarana prevented hyperglycemia after 12 weeks of
176 treatment (but not 16 weeks), hyperinsulinemia, and insulin resistance (estimated using HOMA-IR)
177 (Figure 2A-C). In contrast, the elevated levels of carboxymethyllysine, an advanced glycation end
178 product formed from non-enzymatic reactions between reduced sugars and proteins³⁷, observed in WD-
179 fed rats were not prevented by guarana (Figure 2D). We observed a significant decrease in fasting serum
180 TG in WD-fed rats treated with guarana compared to the controls, whereas in non-fasting animals, we
181 observed a nonsignificant decreasing tendency of TG in guarana-treated groups (Figure 2E). Curiously,
182 despite the guarana effect on weight and fat accumulation, guarana did not affect hepatic fat accumulation
183 (hepatosteatosis) measured by liver TG (Figure 2F). In Figure 2G, we showed that guarana prevented
184 high leptin levels in serum, which is a common hallmark of obesity³⁶. Similarly, guarana prevents
185 adiponectin deregulation (Figure 2H). Consistent with the results presented in Figure 2G, the imbalance
186 favoring leptin in the leptin/adiponectin ratio was restored by guarana (Figure 2I). These results suggest
187 that guarana treatment improved glucose homeostasis and adipokine deregulation. Intriguingly, neither
188 WD nor guarana had any effect on cholesterol or the inflammatory profile (Supplementary Figure S1).

189

190 **Guarana supplementation was not toxic**

191 Many herbal weight-loss supplements have been associated with toxicity⁷, and some studies have
192 suggested possible adverse effects of guarana (in different doses and administration forms than used in
193 this study), such as irritability, heart palpitations, anxiety, and other central nervous system adversities,
194 while other studies have shown no toxicity^{7,9,10,18}. Therefore, having elucidated the great anti-obesity
195 potential of guarana, we decided to determine whether the investigated guarana dose (0.5% supplemented
196 in the diet) chronically administered is toxic. To this end, we first examined whether guarana induces
197 damage to the liver, kidneys, or central nervous system (CNS). We found that guarana did not cause liver
198 damage (Figure 3A-D), and it prevented WD-induced lipoperoxidation (Figure 3B). Consistently, guarana
199 did not lead to loss of renal function (Figure 3E and F). Consistent with the lack of toxicity to the liver
200 and kidneys, we detected no damage to the cortex, hippocampus, or hypothalamus (Figure 3G and H).
201 Intriguingly, WD decreased damage biomarkers in the hippocampus (Figure 3G and H). We next
202 examined whether guarana affects emotional reactivity and/or memory. We first performed an open-field
203 test for 5 min to examine emotional reactivity parameters. Guarana did not induce changes in exploratory
204 behavior (Figure 4I and J), anxiety-like behavior (Figure 3K), or behavioral inhibition (Figure 3L). We
205 then performed a Y-maze test and an object recognition test (ORT) to examine working memory. We did
206 not observe changes in spontaneous alternation or total arm entries in the Y-maze task between groups
207 (Figure 3M and N), which are used to measure short-term memory (working memory). In the Y-maze
208 task, guarana-supplemented rats did not explore more of the novel object at 4 or 24 h, which is an index
209 of recognition memory, suggesting that guarana did not affect working memory or long-term memory.
210 Taken together, these findings indicate that the guarana supplementation used in this study did not induce
211 hepatotoxicity, nephrotoxicity, or neurotoxicity.

212

213 Given that studies have suggested a possible adverse effect of guarana^{7,9,10,18,38}, we calculated the safe
214 human-equivalent dose (HED)^{34,35}. In this study, rats lost weight and did not exhibit adverse effects by
215 consuming approximately 265.67 mg/kg/day of the GSP. Therefore, we found the dose and
216 administration form to be safe and effective in rats. Thus, this value was divided by a conversion factor of
217 6.2 (rat to human) and subsequently divided by a safety factor of 10 in order to obtain the safe HED (4.28

218 mg/kg/day or 0.3 g for a 70 kg individual per day). We suggest that a guarana dose of 4.28 mg/kg/day be
219 used in future clinical trials and that it should be administered with a meal.

220

221 **Guarana induces minor changes in gut microbiota**

222 Given that GSP was effective in reducing weight and was nontoxic, we examined some possible anti-
223 obesity action mechanisms. Evidence has indicated that gut microbiota composition might be associated
224 with the development of obesity and obesity-associated disorders³⁹⁻⁴², so we investigated whether the
225 guarana effects on weight loss and metabolic dysfunction amelioration may be connected to gut
226 microbiota changes. Both guarana and WD did not alter the within-community richness (α -diversity), nor
227 the Firmicutes/Bacteroidetes ratio (Figure 4A and B), which has been linked to human obesity, insulin
228 resistance, dyslipidemia, and inflammation, and also with rodent diet-induced obesity (DIO) models^{40,42-}
229 ⁴⁴. At the genus level, we found an increase in *Butyricoccus* and *Streptococcus* abundance, as well as a
230 decrease in *Holdemania* in the guarana co-treatment group compared to the WD group (Figure 4C-E).
231 The Venn diagram in Figure 4F shows the presence of genera that are specific for each group, as well as
232 the presence of *Bifidobacterium* only in the group fed WD + Gua. *Bifidobacterium* is considered a
233 probiotic that produces benefits for the host health⁴², whereas *Acinetobacter* and *Sphingomonas*, uniquely
234 present in the WD group, have been positively associated with obesity^{39,45,46}. At the species level, we
235 found a decrease in the abundance of *Bacteroides uniformis* and *Bacteroides eggerthii* in the WD and
236 WD + Gua groups compared to the control, but there was no difference between WD and WD + Gua.
237 These results show that guarana induces minor changes in the gut microbiota.

238

239 **Guarana increases BAT mass and activity**

240 Given that BAT activation has been associated with obesity protection^{19,47} and that guarana decreased
241 weight gain and prevented excessive fat accumulation (Figure 1A-D), we investigated whether guarana
242 leads to BAT activation. An increase in BAT weight was observed only in the WD + Gua group
243 compared to the control (Figure 5A). In parallel, the BAT mitochondrial copy number was higher in rats
244 fed WD + Gua than in rats fed WD (Figure 5B). Consistent with the increase in mitochondrial number,
245 UCPI immunocontent increased in the WD + Gua group (Figure 5C and F). To identify the mitogenesis
246 pathway and metabolic activation of BAT, we examined the protein content of Sirt1 and
247 phosphorylation/activation of AMPK, which act as intracellular energy sensors regulating the energy

248 status by stimulating mitochondrial biogenesis and catabolic processes to increase ATP production when
249 cells encounter an energy crisis^{28,29}. Sirt1 immunocentent did not differ between groups, but AMPK
250 phosphorylation/activation was higher in rats fed WD + Gua than in rats fed control chow (Figure 5D-G).
251 Collectively, these data suggest that guarana, in association with WD, promoted BAT activation (BAT
252 expansion, mitochondrial biogenesis, UCP1 overexpression, and AMPK activation).

253

254 **Docking**

255 Several allosteric AMPK activators have been described. Among them are natural compounds derived
256 from plants and synthetics, such as A-769662, PF-06409577, PF-249, PF-739, and salicylate⁴⁸. Most of
257 these activators bind to a specific region of AMPK located between the regulatory β -subunit and the
258 catalytic α -subunit, protecting against AMPK dephosphorylation^{48,49}. Thus, we investigated by molecular
259 docking whether four guarana compounds present in GSP could act as direct AMPK activators. All tested
260 compounds (caffeine, theobromine, catechin, and epicatechin) were shown to bind to the same site of the
261 described activators (and therefore, are putative AMPK activators) in both rat and human AMPK (Figure
262 6A and B). In rat AMPK, catechin and theobromine have a greater probability of interaction with the
263 AMPK activation site than PF-06409577 and salicylate do, whereas caffeine and epicatechin have a
264 greater probability of interaction than salicylate does (Figure 6A). The interactions of the ligands with the
265 amino acid residues of rat AMPK are shown in Supplementary Table S3. Our data from molecular
266 docking suggest that caffeine, theobromine, catechin, and epicatechin directly activate AMPK. Other
267 studies have also used the docking approach to find possible AMPK activators^{50,51}. We then examined
268 whether rat and human AMPK had a well-conserved structure using the Protein Data Bank (PDB) blast
269 sequence. We found an identity of approximately 80% and similarity of approximately 90% between rat
270 and human AMPK. The superposition of rat and human AMPK is shown in Figure 6C. Then, we
271 investigated whether the four guarana compounds could also act as direct human-AMPK activators to
272 predict if the guarana compound can act in humans. In human AMPK, epicatechin showed the second
273 highest score, suggesting a greater probability of interaction with the AMPK activation site than the other
274 compounds, including the known activators (Figure 6B). The interactions of the ligands with the amino
275 acid residues of human AMPK are shown in Supplementary Table S4. Together, our data indicate that at
276 least four guarana compounds could activate rat and human AMPK and contribute to BAT activation.

277

278 **DISCUSSION**

279

280 It has been shown that reducing body weight by $\geq 5\%$ has many beneficial effects on health. However,
281 many current anti-obesogenic therapies have limited effectiveness and/or adverse effects⁵. Thus,
282 identifying safe therapies that contribute to weight reduction is of great importance. Therefore, we
283 assessed the effectiveness and possible mechanisms of action, as well as the toxicity, of guarana seed
284 powder (GSP) in a rat diet-induced obesity model. Overall, we showed that GSP supplemented to the
285 Western diet (WD) prevented weight gain, insulin resistance, and adipokine dysregulation induced by
286 WD as compared to the control diet. Moreover, we proposed the BAT activation as one of the action
287 mechanisms of guarana in reducing body weight and that AMPK activation may contribute to BAT
288 activation. Finally, we showed that the dose and administration form used here did not induce toxic
289 effects.

290

291 Insulin resistance and adipokine dysregulation are two common metabolic disorders related to obesity,
292 which may connect obesity and T2D^{52,53}. Overweight and obesity are the main risk factors for T2D; ~80%
293 of the people who develop T2D are overweight or obese⁵⁴. Therefore, compounds that act not only by
294 reducing weight but also by controlling other metabolic disorders, such as insulin resistance, are more
295 appropriate as therapeutic agents. Here, we have shown that GSP prevented weight gain, insulin
296 resistance, and adipokine dysregulation induced by WD as compared to the control diet. Moreover,
297 insulin resistance is more intense in young obese people than in adult obese people, leading to a high risk
298 of developing juvenile T2D, which is characterized by high therapeutic failure rates. In this regard, a
299 relevant finding was that GSP supplemented to WD prevented the high glucose levels induced by WD as
300 compared to the control diet. Given that AMPK activation is associated with metabolic dysfunction
301 amelioration^{55,56}, we speculate that a direct AMPK activation by guarana compounds may be underlying
302 the observed metabolic amelioration.

303

304 Guarana has been utilized in various doses and administration forms, with controversial outcomes,
305 sometimes producing adverse effects as aforementioned, and sometimes producing no toxicity and
306 beneficial effects^{17,38,57,58} or contradictory effects^{12,14}. In this study, we were able to determine an effective

307 and nontoxic dose and administration form. Furthermore, we suggest a safe HED of guarana to be used in
308 future clinical trials, preferentially together with meals.

309

310 Regarding the mechanism of action of guarana, we found only minor changes in gut microbiota, which
311 may be a reflection of the improved metabolic state. Despite other studies showing that plant extracts may
312 protect against metabolic dysfunction by modulating gut microbiota^{6,59,60}, in this study, we did not find a
313 connection between metabolic amelioration and gut microbiota modulation. Interestingly, diet-induced
314 obese mice treated with green and black tea showed an increase in hepatic AMPK activation, which was
315 associated with gut microbiota modulation⁶. Another explored mechanism was BAT activation.
316 Accumulating evidence has demonstrated that BAT activation is a potential target for the treatment of
317 obesity and metabolic syndrome^{19,61}. In the present study, guarana activated BAT by promoting mass
318 increase, mitochondrial biogenesis, and UCP1 overexpression, which are important mechanisms of BAT
319 activation^{21,22}. Corroborating our data, many other extracts/compounds effective in weight management
320 have been shown to activate BAT in humans and animal models²³⁻²⁶.

321

322 Because AMPK plays a critical role in the regulation of energy metabolism, it has attracted widespread
323 interest as a potential therapeutic target of drugs for treating metabolic diseases, including obesity and
324 T2D^{48,62}. Indeed, many activators of AMPK have shown great results in the treatment of metabolic
325 disorders⁵⁵. Given that AMPK activation may promote mitochondrial biogenesis²⁸, we suggest that the
326 increased mitochondrial biogenesis in BAT induced by guarana resulted from AMPK activation. This
327 hypothesis was reinforced by our molecular docking data, which suggested that guarana compounds
328 directly activate AMPK.

329

330 Consistent with our data, other studies have shown that many plant extracts rich in catechins and
331 methylxanthines, like guarana, may activate AMPK concomitantly with reducing weight^{6,27} and increase
332 energy expenditure^{24,63-65}. Interestingly, when administered together, catechin and caffeine increase
333 energy expenditure in subjects with metabolically active BAT but not in subjects with negligible
334 activity²⁴, suggesting that the anti-obesity effect of catechin and caffeine occurs via BAT activation.

335

336 In summary, we propose that BAT activation is one of the action mechanisms of guarana in reducing
337 weight and that AMPK activation may contribute to BAT activation by promoting mitochondrial
338 biogenesis. Moreover, molecular docking suggests that guarana compounds directly activate AMPK.
339 Finally, we have shown that the dose and administration form used here did not induce toxic effects or
340 promote large changes in gut microbiota.

341

342

343 **ACKNOWLEDGEMENTS**

344 Funding for this project was provided by the Brazilian funding agencies CNPq (402471/2013-0), CAPES,
345 FAPERGS (PRONEX 16/2551-0000 499-4), PROPESQ-UFRGS, and FIPE (150542).

346

347 **CONFLICT OF INTEREST**

348 The authors declare no conflict of interest.

349

350 **Supplementary information** is available at the *International Journal of Obesity* website.

351 Supplementary Material and Methods

352 Supplementary Tables S1-S4

353 Supplementary Figure S1

354

355

356

357 **REFERENCES**

- 358 1 González-Muniesa P, Martínez-González M-A, Hu FB, Després J-P, Matsuzawa Y, Loos RJF *et*
359 *al.* Obesity. *Nat Rev Dis Prim* 2017; **3**: 17034.
- 360 2 Maffetone PB, Laursen PB. The prevalence of overfat adults and children in the US. *Front Public*
361 *Heal* 2017; **5**: 1–9.
- 362 3 Maffetone PB, Rivera-Dominguez I, Laursen PB. Overfat adults and children in developed
363 countries: The public health importance of identifying excess body fat. *Front Public Heal* 2017;
364 **5**: 1–11.
- 365 4 Blanck HM, Serdula MK, Gillespie C, Galuska DA, Sharpe PA, Conway JM *et al.* Use of
366 nonprescription dietary supplements for weight loss is common among Americans. *J Am Diet*
367 *Assoc* 2007; **107**: 441–447.
- 368 5 Martel J, Ojcius DM, Chang C-J, Lin C-S, Lu C-C, Ko Y-F *et al.* Anti-obesogenic and
369 antidiabetic effects of plants and mushrooms. *Nat Rev Endocrinol* 2016; **13**: 149–160.
- 370 6 Henning SM, Yang J, Hsu M, Lee R-P, Grojean EM, Ly A *et al.* Decaffeinated green and black
371 tea polyphenols decrease weight gain and alter microbiome populations and function in diet-
372 induced obese mice. *Eur J Nutr* 2017; : 1–11.
- 373 7 Pittler MH, Schmidt K, Ernst E. Adverse events of herbal food supplements for body weight
374 reduction: systematic review. *Obes Rev* 2005; **6**: 93–111.
- 375 8 Mansi IA, Huang J. Rhabdomyolysis in response to weight-loss herbal medicine. *Am J Med Sci*
376 2004; **327**: 356–357.
- 377 9 Ioannides-Demos LL, Proietto J, Tonkin AM, McNeil JJ. Safety of drug therapies used for weight
378 loss and treatment of obesity. *Drug Saf* 2006; **29**: 277–302.
- 379 10 Restani P, Di Lorenzo C, Garcia-Alvarez A, Badea M, Ceschi A, Egan B *et al.* Adverse effects of
380 plant food supplements self-reported by consumers in the PlantLIBRA survey involving six
381 european countries. *PLoS One* 2016; **11**: 1–20.
- 382 11 Ângelo PCS, Nunes-Silva CG, Brígido MM, Azevedo JSN, Assunção EN, Sousa ARB *et al.*
383 Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain

- 384 forest: The seeded-fruit transcriptome. *Plant Cell Rep* 2008; **27**: 117–124.
- 385 12 Boozer CN, Nasser J a, Heymsfield SB, Wang V, Chen G, Solomon JL. An herbal supplement
386 containing Ma Huang-Guarana for weight loss: a randomized, double-blind trial. *Int J Obes* 2001;
387 **25**: 316–324.
- 388 13 Rodrigues M, Alves G, Lourenço N, Falcão A. Herb-Drug interaction of Paullinia cupana
389 (Guarana) seed extract on the pharmacokinetics of amiodarone in rats. *Evidence-Based
390 Complement Altern Med* 2012; **2012**: 1–10.
- 391 14 Martins SP dos S, Ferreira CL, del Giglio A. Placebo-controlled, double-blind, randomized study
392 of a dry guarana extract in patients with head and neck tumors undergoing chemoradiotherapy:
393 effects on fatigue and quality of life. *J Diet Suppl* 2017; **14**: 32–41.
- 394 15 Opala T, Rzymiski P, Pischel I, Wilczak M, Wozniak J. Efficacy of 12 weeks supplementation of
395 a botanical extract-based weight loss formula on body weight, body composition and blood
396 chemistry in healthy, overweight subjects - A randomised double-blind placebo-controlled
397 clinical trial. *Eur J Med Res* 2006; **11**: 343–350.
- 398 16 Andersen T, Fogh J. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American
399 herbal preparation in overweight patients. *J Hum Nutr Diet* 2001; **14**: 243–250.
- 400 17 Costa Krewer C, Ribeiro EE, Ribeiro EAM, Moresco RN, Ugalde Marques da Rocha MI, Santos
401 Montagner GFF *et al.* Habitual intake of guaraná and metabolic morbidities: An epidemiological
402 study of an elderly Amazonian population. *Phyther Res* 2011; **25**: 1367–1374.
- 403 18 Baghkhani L, Jafari M. Cardiovascular adverse reactions associated with guarana. *J Herb
404 Pharmacother* 2002; **2**: 57–61.
- 405 19 Poekes L, Lanthier N, Leclercq IA. Brown adipose tissue: a potential target in the fight against
406 obesity and the metabolic syndrome. *Clin Sci* 2015; **129**: 933–949.
- 407 20 Fenzl A, Kiefer FW. Brown adipose tissue and thermogenesis. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2014;
408 **19**: 25–37.
- 409 21 Lidell ME, Betz MJ, Enerbäck S. Brown adipose tissue and its therapeutic potential. *J Intern Med*
410 2014; **276**: 364–377.

- 411 22 Sanchez-Delgado G, Martínez-Tellez B, Olza J, Aguilera CM, Gil Á, Ruiz JR. Role of exercise in
412 the activation of brown adipose tissue. *Ann Nutr Metab* 2015; **67**: 21–32.
- 413 23 Saito M, Yoneshiro T. Capsinoids and related food ingredients activating brown fat
414 thermogenesis and reducing body fat in humans. *Curr Opin Lipidol* 2013; **24**: 71–77.
- 415 24 Yoneshiro T, Matsushita M, Hibi M, Tone H, Takeshita M, Yasunaga K *et al*. Tea catechin and
416 caffeine activate brown adipose tissue and increase cold-induced thermogenic capacity in
417 humans. *Am J Clin Nutr* 2017; **105**: 873–881.
- 418 25 Oi-Kano Y, Kawada T, Watanabe T, Koyama F, Watanabe K, Senbongi R *et al*. Oleuropein, a
419 phenolic compound in extra virgin olive oil, increases uncoupling protein 1 content in brown
420 adipose tissue and enhances noradrenaline and adrenaline secretions in rats. *J Nutr Sci Vitaminol*
421 *(Tokyo)* 2008; **54**: 363–370.
- 422 26 Yuan X, Wei G, You Y, Huang Y, Lee HJ, Dong M *et al*. Rutin ameliorates obesity through
423 brown fat activation. *FASEB J* 2017; **31**: 333–345.
- 424 27 Jeong M-Y, Kim H-L, Park J, Jung Y, Youn D-H, Lee J-H *et al*. Rubi Fructus (*Rubus coreanus*)
425 activates the expression of thermogenic genes in vivo and in vitro. *Int J Obes* 2015; **39**: 456–464.
- 426 28 Cantó C, Auwerx J. Calorie restriction: is AMPK a key sensor and effector? *Physiology*
427 *(Bethesda)* 2011; **26**: 214–224.
- 428 29 Morris BJ. Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radic Biol Med* 2013; **56**: 133–
429 171.
- 430 30 National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th ed. The
431 National Academies Press (US), 2011.
- 432 31 Bittencourt L da S, Zeidán-Chuliá F, Yatsu FKJ, Schnorr CE, Moresco KS, Kolling EA *et al*.
433 Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) prevents β -amyloid aggregation, generation of advanced
434 glycation-end products (AGEs), and acrolein-induced cytotoxicity on human neuronal-like cells.
435 *Phyther Res* 2014; **28**: 1615–1624.
- 436 32 Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of
437 the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-

- 438 76A rodent diet. *J Nutr* 1993; **123**: 1939–1951.
- 439 33 Bortolin RC, Vargas AR, Gasparotto J, Chaves PR, Schnorr CE, Martinello KB *et al.* A new
440 animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to
441 high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. *Int J Obes* 2017; :
442 1–30.
- 443 34 Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited.
444 *FASEB J* 2007; **22**: 659–661.
- 445 35 Sharma V, McNeill JH. To scale or not to scale: The principles of dose extrapolation. *Br J*
446 *Pharmacol* 2009; **157**: 907–921.
- 447 36 Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of
448 human obesity in rodents. *Obesity* 2007; **15**: 798–808.
- 449 37 Ahmad S, Khan MS, Akhter F, Khan MS, Khan A, Ashraf JM *et al.* Glycoxidation of biological
450 macromolecules: A critical approach to halt the menace of glycation. *Glycobiology* 2014; **24**:
451 979–990.
- 452 38 Mattei R, Dias R., Espínola E., Carlini E., Barros SB. Guarana (*Paullinia cupana*): toxic
453 behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. *J Ethnopharmacol* 1998;
454 **60**: 111–116.
- 455 39 Shen J, Obin MS, Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med*
456 2013; **34**: 39–58.
- 457 40 Sonnenburg JL, Bäckhed F. Diet–microbiota interactions as moderators of human metabolism.
458 *Nature* 2016; **535**: 56–64.
- 459 41 Lecomte V, Kaakoush NO, Maloney CA, Raipuria M, Huinao KD, Mitchell HM *et al.* Changes in
460 gut microbiota in rats fed a high fat diet correlate with obesity-associated metabolic parameters.
461 *PLoS One* 2015; **10**: e0126931.
- 462 42 Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK, Dumas M-E. Impact of the gut microbiota on
463 inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Med* 2016; **8**: 42.
- 464 43 Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but

- 465 reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 2008; **3**: 213–223.
- 466 44 Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G *et al.* Richness of human gut
467 microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 2013; **500**: 541–546.
- 468 45 Chiu CM, Huang WC, Weng SL, Tseng HC, Liang C, Wang WC *et al.* Systematic analysis of the
469 association between gut flora and obesity through high-throughput sequencing and bioinformatics
470 approaches. *Biomed Res Int* 2014; **2014**: 1–11.
- 471 46 Kotzampassi K, Giamarellos-Bourboulis EJ, Stavrou G. Obesity as a consequence of gut bacteria
472 and diet interactions. *ISRN Obes* 2014; **2014**: 1–8.
- 473 47 Honek J, Lim S, Fischer C, Iwamoto H, Seki T, Cao Y. Brown adipose tissue, thermogenesis,
474 angiogenesis: Pathophysiological aspects. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2014; **19**: 5–11.
- 475 48 Grahame Hardie D. Regulation of AMP-activated protein kinase by natural and synthetic
476 activators. *Acta Pharm Sin B* 2016; **6**: 1–19.
- 477 49 Xiao B, Sanders MJ, Carmena D, Bright NJ, Haire LF, Underwood E *et al.* Structural basis of
478 AMPK regulation by small molecule activators. *Nat Commun* 2013; **4**: 1–10.
- 479 50 Tang H-C, Chen CY-C. In silico design for adenosine monophosphate-activated protein kinase
480 agonist from traditional chinese medicine for treatment of metabolic syndromes. *Evidence-Based
481 Complement Altern Med* 2014; **2014**: 1–16.
- 482 51 Huang T, Sun J, Zhou S, Gao J, Liu Y. Identification of direct activator of adenosine
483 monophosphate-activated protein kinase (AMPK) by structure-based virtual screening and
484 molecular docking approach. *Int J Mol Sci* 2017; **18**: 1408.
- 485 52 Martyn JAJ, Kaneki M, Yasuhara S. Obesity-induced insulin resistance and hyperglycemia.
486 *Anesthesiology* 2008; **109**: 137–148.
- 487 53 Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; **106**: 473–481.
- 488 54 Smyth S, Heron A. Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nat Med* 2006; **12**: 75–80.
- 489 55 Cool B, Zinker B, Chiou W, Kifle L, Cao N, Perham M *et al.* Identification and characterization
490 of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the

- 491 metabolic syndrome. *Cell Metab* 2006; **3**: 403–416.
- 492 56 Cokorinos EC, Delmore J, Reyes AR, Albuquerque B, Kjøbsted R, Jørgensen NO *et al.*
493 Activation of skeletal muscle AMPK promotes glucose disposal and glucose lowering in non-
494 human primates and mice. *Cell Metab* 2017; **25**: 1147–1159.e10.
- 495 57 Peixoto H, Roxo M, Röhrig T, Richling E, Wang X, Wink M. Anti-aging and antioxidant
496 potential of paullinia cupana var. sorbilis: Findings in *Caenorhabditis elegans* indicate a new
497 utilization for roasted seeds of guarana. *Medicines* 2017; **4**: 61.
- 498 58 Kober H, Tatsch E, Torbitz VD, Cargnin LP, Sangoi MB, Bochi GV *et al.* Genoprotective and
499 hepatoprotective effects of Guarana (*Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*) on CCl₄-induced
500 liver damage in rats. *Drug Chem Toxicol* 2016; **39**: 48–52.
- 501 59 Anhô FF, Roy D, Pilon G, Dudonné S, Matamoros S, Varin T V *et al.* A polyphenol-rich
502 cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal
503 inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of
504 mice. *Gut* 2014; : 1–12.
- 505 60 Wang J-H, Bose S, Kim H-G, Han K-S, Kim H. Fermented Rhizoma *Atractylodes* Macrocephalae
506 alleviates high fat diet-induced obesity in association with regulation of intestinal permeability
507 and microbiota in rats. *Sci Rep* 2015; **5**: 8391.
- 508 61 Roman S, Agil A, Peran M, Alvaro-Galve E, Ruiz-Ojeda FJ, Fernández-Vázquez G *et al.* Brown
509 adipose tissue and novel therapeutic approaches to treat metabolic disorders. *Transl Res* 2015;
510 **165**: 464–479.
- 511 62 Hardie DG. AMPK: A key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism.
512 *Int J Obes* 2008; **32**: S7–S12.
- 513 63 Bérubé-Parent S, Pelletier C, Doré J, Tremblay A. Effects of encapsulated green tea and Guarana
514 extracts containing a mixture of epigallocatechin-3-gallate and caffeine on 24 h energy
515 expenditure and fat oxidation in men. *Br J Nutr* 2005; **94**: 432.
- 516 64 Hursel R, Viechtbauer W, Dulloo AG, Tremblay A, Tappy L, Rumpler W *et al.* The effects of
517 catechin rich teas and caffeine on energy expenditure and fat oxidation: A meta-analysis. *Obes*

- 518 *Rev* 2011; **12**: 573–581.
- 519 65 Dulloo AG. The search for compounds that stimulate thermogenesis in obesity management:
520 From pharmaceuticals to functional food ingredients. *Obes Rev* 2011; **12**: 866–883.
- 521

522 **FIGURE LEGENDS**

523

524 **Figure 1 | Anti-obesity effect of guarana in DIO model. (A)** Body weight (g) development during 16-
525 week treatment (asterisks are showed differences between Control and WD). **(B)** Weight gain (g) in 16-
526 week treatment. **(C)** Total white adipose tissue (WAT) (g) in 18-week treatment. **(D)** Adiposity index
527 (WAT weight/body weight) in 18-week treatment. **(E)** Cumulative food intake (g/rat) in 16-week
528 treatment. **(F)** Cumulative energy intake (Kcal/rat) in 16-week treatment. Data are expressed as means ±
529 SEM. **(A-B)** n = 12 and **(C-D)** n = 8. **(E-F)** data relating to 12 animals. Significant differences are
530 indicated by * p < 0.05, ** p < 0.01 or *** p < 0.001 (ANOVA followed by Tukey between Control,
531 WD, and WD + Gua groups).

532

533

534

535 **Figure 2 | Guarana attenuates insulin resistance and hyperleptinemia. (A)** Fasting serum glucose
536 (mg/dL) in 12 and 16-week treatment. **(B)** Serum fasting insulin expressed in µg/L. **(C)** Insulin resistance
537 measured by the homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index. **(D)** Evaluation
538 of serum advanced glycation end products assessed by N^ε-carboxymethyllysine levels (% of control). **(E)**
539 Fasting and feeding serum triglycerides (TG) (mg/dL). **(F)** Liver TG levels expressed in mg/g of protein.
540 **(G)** Fasting serum leptin expressed as ng/mL. **(H)** Fasting serum adiponectin expressed as µg/mL. **(I)**
541 Balance between the adipokines of opposite effects was assessed using the leptin/adiponectin ratio. Data
542 are expressed as means ± SEM. **(A-I)** n = 8-12. Significant differences are indicated by * p < 0.05, ** p <
543 0.01 or *** p < 0.001 (ANOVA followed by Tukey between Control, WD, and WD + Gua groups).

544

545

546

547 **Figure 3 | Guarana supplementation used in this study was not toxic. (A-D)** The guarana dose
548 supplemented to WD (0.5%) did not lead to liver damage and renal function alteration in the animals. **(A)**
549 Liver protein damage expressed as nmol carbonyl groups/mg protein. **(B)** Liver lipip peroxidation level
550 expressed as nmol thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)/mg protein. **(C)** Serum aspartate
551 aminotransferase level (U/L). **(D)** Serum alanine aminotransferase level (U/L). **(E-F)** Nephrotoxicity

552 evaluation of guarana dose. **(E)** Serum creatinine level (mg/dL). **(F)** Serum uric acid level (mg/dL). **(G-**
553 **H)** Protein damage and Lipid peroxidation level on cortex, hippocampus, and hypothalamus. Data are
554 expressed as means \pm SEM. Significant differences (n = 8) are indicated by * p < 0.05 and ** p < 0.01
555 (ANOVA followed by Tukey). **(I-P)** Guarana supplementation (0.5%) did not induce behavior changes or
556 memory impairment in Wistar rats. **(I-L)** Emotional behavioral parameters in open-field test: total distance
557 as a measure of horizontal exploratory activity **(I)**, rearing time as a measure of vertical exploratory
558 activity **(J)**, center time as a measure of anxiety-like behavior **(K)**, and freezing time as a measure of
559 behavioral inhibition **(L)**. **(M-P)** Behavioral parameters in learning and memory tasks: **(M)** % of
560 spontaneous alternation and **(N)** total entries in arms in the Y-maze test as a measure of spatial working
561 memory, and **(O-P)** time of novel object exploration 4h **(O)** and 24 h **(P)** after object familiarization in
562 the novel object recognition task as a measure of short and long-term recognize memory, respectively.
563 Data are expressed as means \pm SEM. Significant differences (n = 12) are indicated by * p < 0.05
564 (ANOVA followed by Tukey).

565

566

567 **Figure 4 | Guarana induces minor changes in the gut microbiota.** **(A)** Calculations of within-
568 community richness (α -diversity) by Chao1 estimate. **(B)** Calculation of ration between Firmicutes and
569 Bacteroidetes phyla. **(A-B)** Data are expressed as means \pm SEM. Significant differences (n = 4) are
570 indicated by * p < 0.05 (ANOVA followed by Tukey). **(C-E)** Relative abundances of statistically
571 different genera: **(C)** *Butyricicoccus*, **(D)** *Holdemania*, and **(E)** *Streptococcus*. **(F)** Venn diagram showing
572 presence of unique genera of each group. **(G-H)** Relative abundances of statistically different species: **(C)**
573 *Bacteroides uniformis* and **(H)** *Bacteroides eggerthii*. **(C-E and G-H)** The box-plot shows the median of
574 the data as a line, the mean of the data as a star, and data points outside of the whiskers as crosses.
575 Significant differences (n = 4) are indicated by * p < 0.05 and ** p < 0.01 (ANOVA followed by Tukey-
576 Kramer post hoc).

577

578 **Figure 5 | Guarana promotes BAT activation.** Guarana supplemented to WD increased BAT mass **(A)**,
579 promote mitochondrial biogenesis in BAT (mtDNA copy number) **(B)**, increase UCP1 immunocontent **(C**
580 **and F)**, did not shown any difference different in the Sirt1 immunocontent **(D and F)**, and increase

581 phosphorylation/activation of AMPK (**E and G**) . Data are expressed as means \pm SEM. (**A**) n = 8 and (**B-**
582 **G**) n = 6. Significant differences are indicated by * p < 0.05, ** p < 0.01 or *** p < 0.001 (ANOVA
583 followed by Tukey between Control, WD, and WD + Gua groups).

584

585 **Figure 6 | Molecular docking summary for AMPK and ligands inspected in this work.** The detail
586 (rightmost panel) is rotated in respect to the central image for clarity. (A) Rat AMPK. (B) Human AMPK.
587 (C) Superposition of rat and human AMPK structures (yellow and blue, respectively), highlighting their
588 fold similarity (all-atom RMS of 1.5Å).

589

590

Figure 1

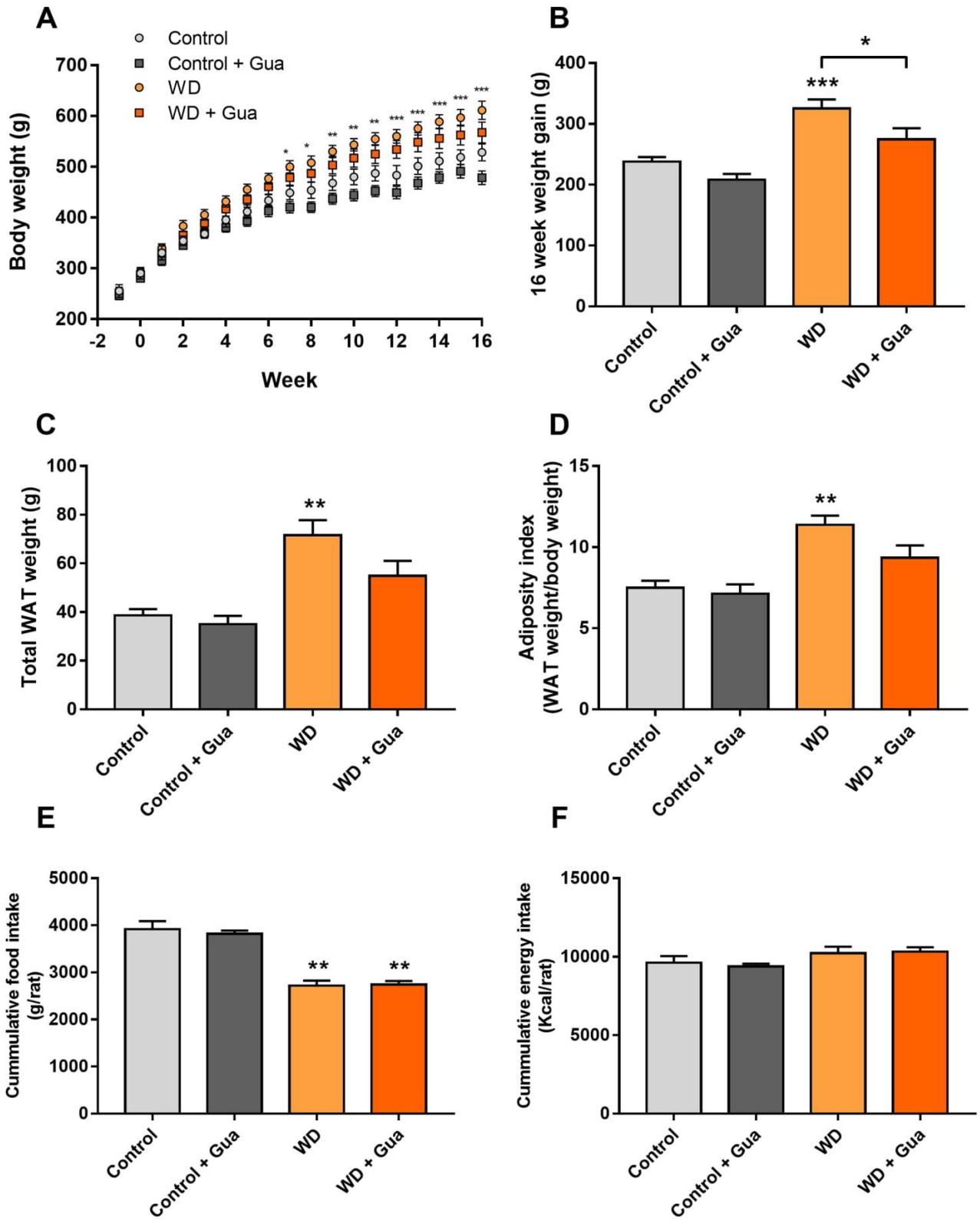


Figure 2

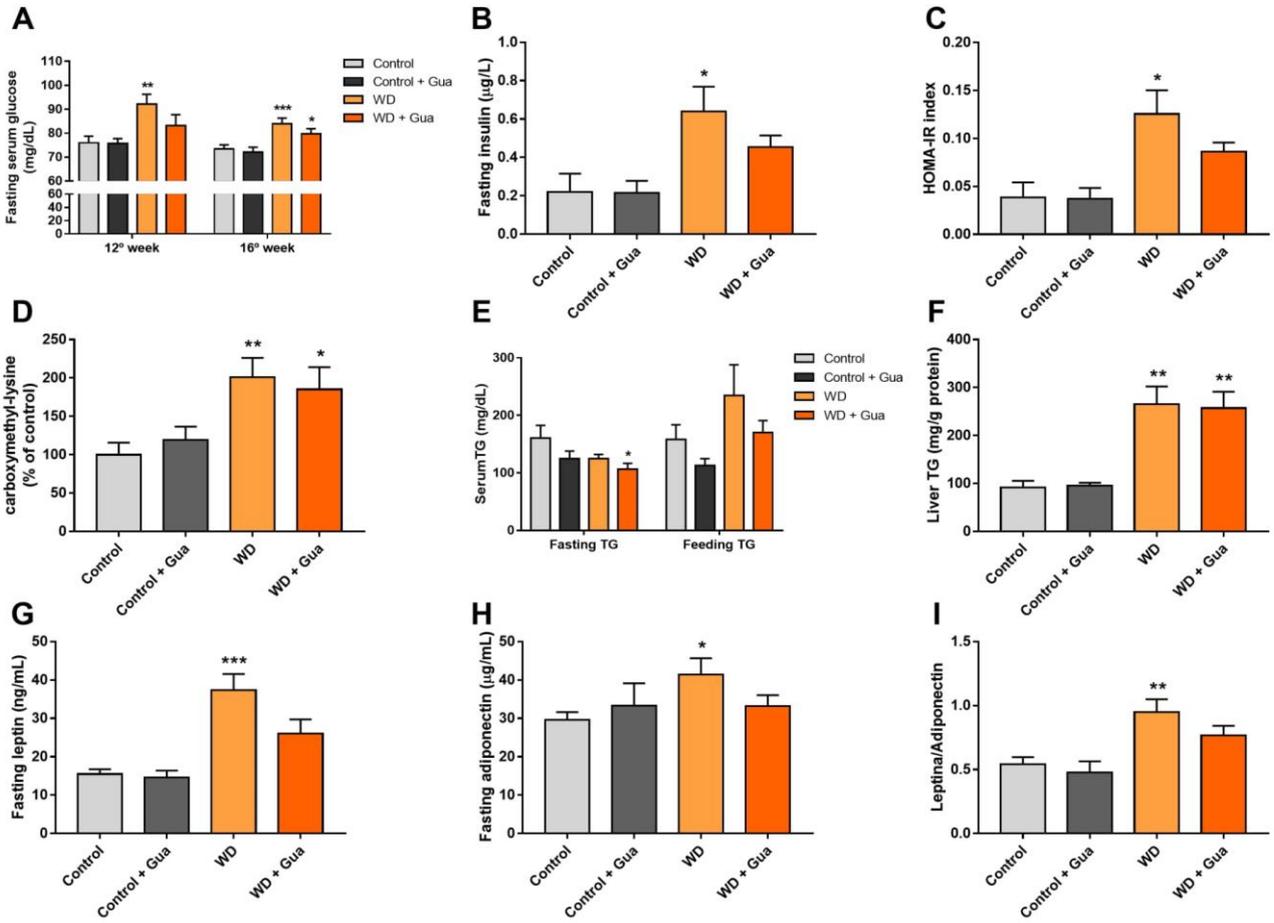


Figure 3

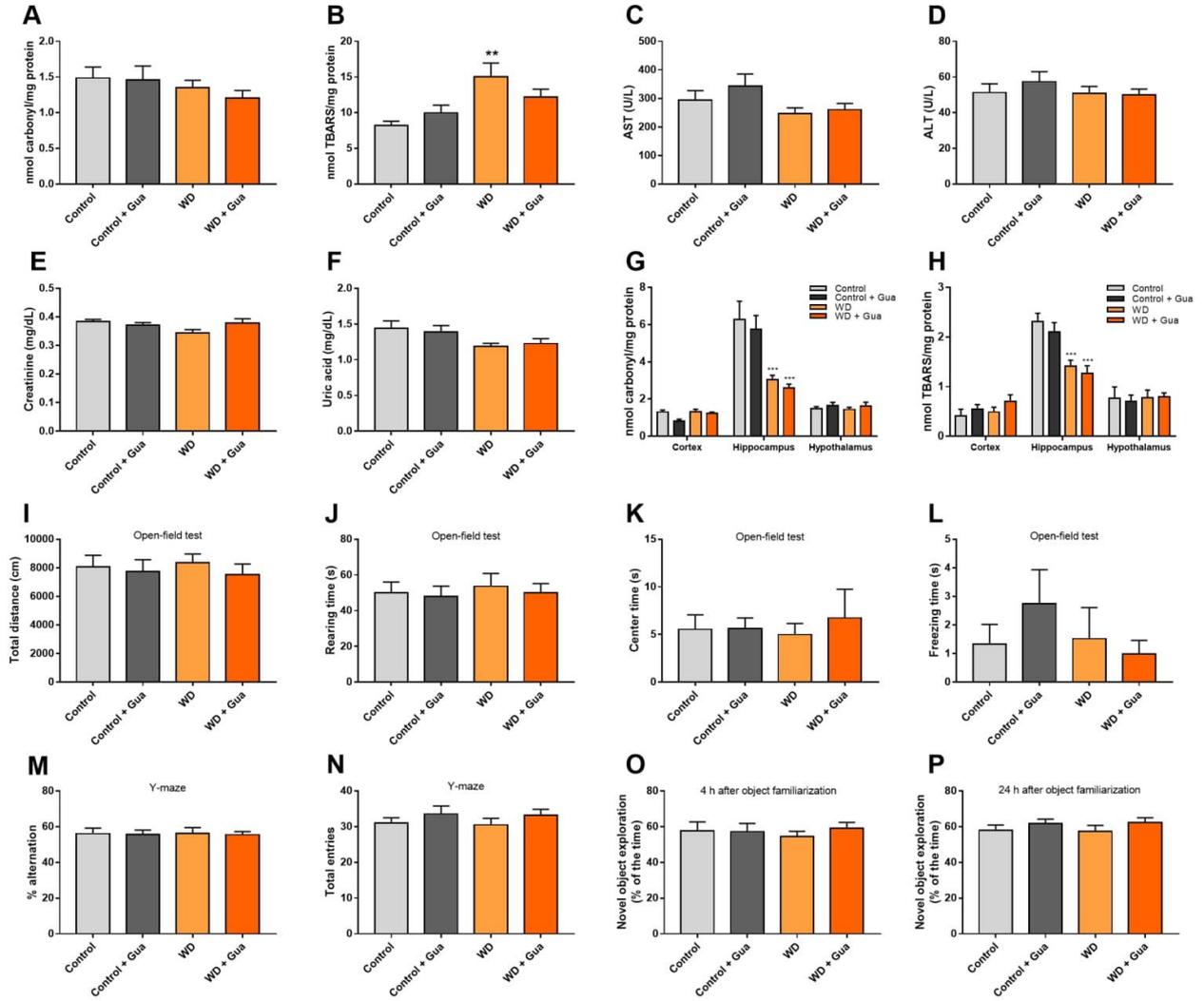


Figure 4

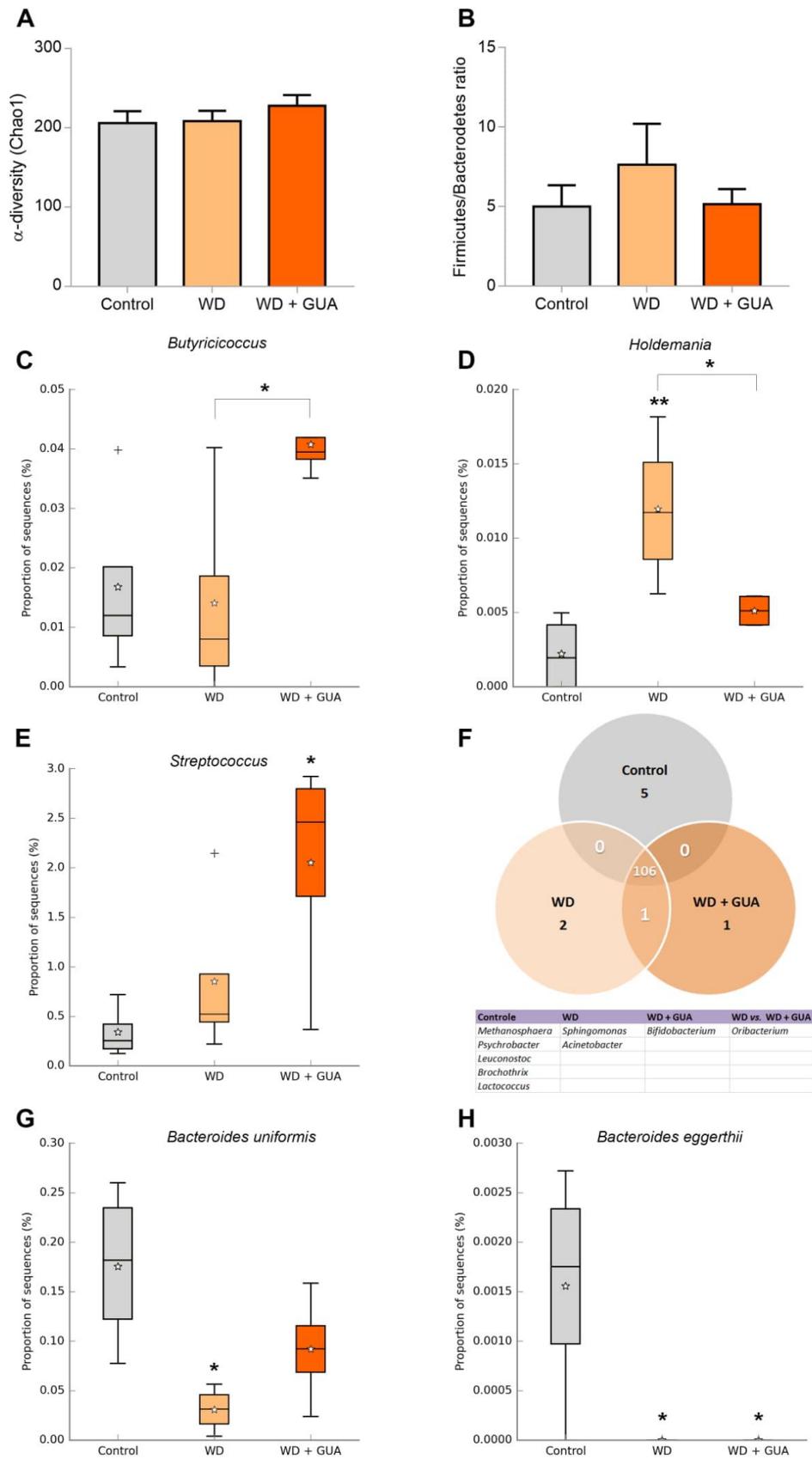


Figure 5

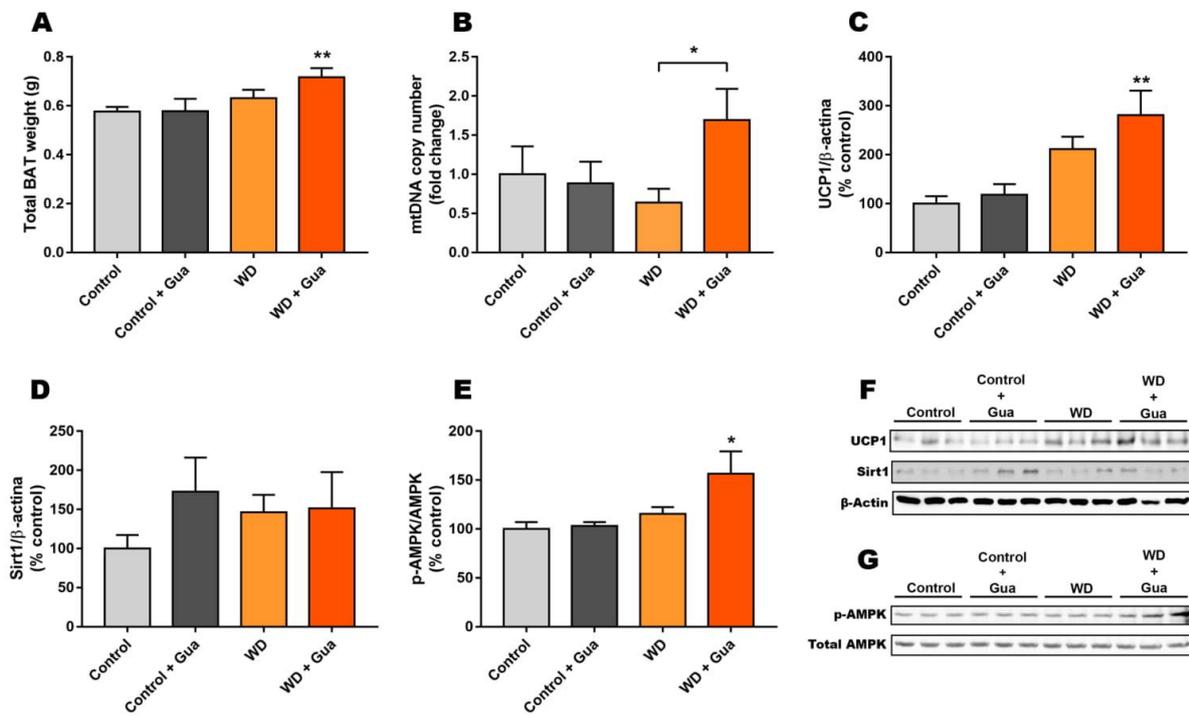
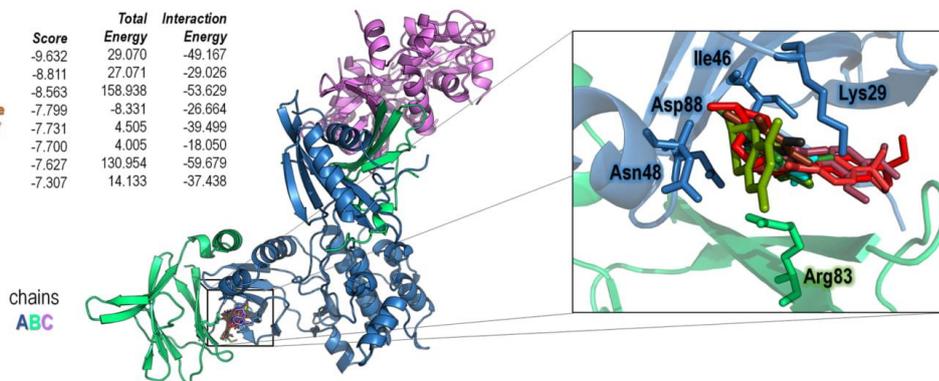


Figure 6

A

Rat AMPK

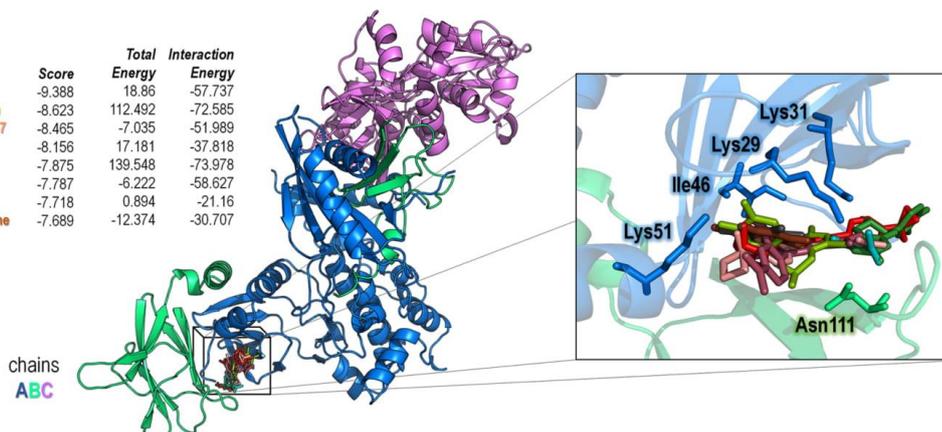
Ranking	Compound	Score	Total Energy	Interaction Energy
1	PF-739	-9.632	29.070	-49.167
2	PF-249	-8.811	27.071	-29.026
3	Catechin	-8.563	158.938	-53.629
4	Theobromine	-7.799	-8.331	-26.664
5	PF-06409577	-7.731	4.505	-39.499
6	Caffeine	-7.700	4.005	-18.050
7	Epicatechin	-7.627	130.954	-59.679
8	Salicylate	-7.307	14.133	-37.438



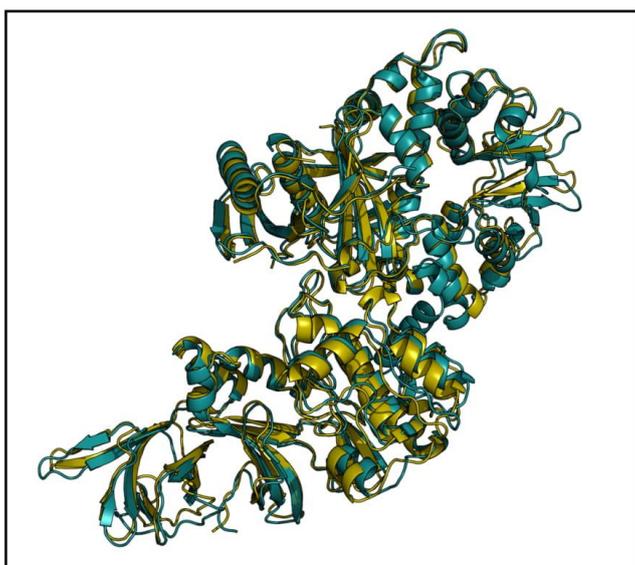
B

Human AMPK

Ranking	Compound	Score	Total Energy	Interaction Energy
1	PF-739	-9.388	18.86	-57.737
2	Epicatechin	-8.623	112.492	-72.585
3	PF-06409577	-8.465	-7.035	-51.989
4	PF-249	-8.156	17.181	-37.818
5	Catechin	-7.875	139.548	-73.978
6	Salicylate	-7.787	-6.222	-58.627
7	Caffeine	-7.718	0.894	-21.16
8	Theobromine	-7.689	-12.374	-30.707



C



1 **Supplementary Materials and Methods**

2 **Body weight and food intake**

3 The amount of food consumed per cage was monitored by calculating the difference between the weight of the
4 food offered and the weight of the food removed two days later. Individual animals were weighted once a week.

5

6 **Material collection**

7 After 16 weeks of the experimental diet, animals were fasted overnight (12 h) and 0.5 mL of blood was collect
8 via a tail snip procedure, whereby a cut is made 1 mm from the tip of the tail using scalpel blade. Moreover,
9 fresh fecal pellets were collected in clean boxes and stored at -80°C for DNA extraction and microbiota
10 composition analysis. Serum was also separated after blood clot formation by centrifugation at $2000 \times g$ for 10
11 min at 15°C and stored at -80°C . Furthermore, after 18 weeks of the experimental diet, animals were sacrificed
12 by decapitation. Blood was collected and serum was separated by centrifugation after clot formation as
13 described. Liver and white adipose tissues (WATs) were rapidly isolated, washed in ice-cold 50 mM phosphate
14 buffer saline (PBS) (pH 7.4), patted dry, and weighed before storage at -80°C .

15

16 **Adiposity index**

17 To calculate the adiposity index, total body fat was divided by body weight as follows:
18 $[(\text{epididymal} + \text{visceral} + \text{retroperitoneal} + \text{omental}) / \text{final body weight}] \times 100$.

19

20 **Lipid profile**

21 The fasting serum lipid profile (triglycerides (TG), total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol,
22 and low-density lipoprotein (LDL) cholesterol), feeding serum TG, and liver TG were determined using an
23 automatic biochemical analyzer (Konelab® 30i, Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland) with specific
24 analysis kits by the Wiener lab group (Rosario, Argentina). To measure liver TG, liver homogenate was diluted
25 to $6 \mu\text{g}$ of protein/ μL in 50 mM PBS (pH 7.4).

26

27 **Serum metabolites, alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST)**

28 Serum uric acid (UA), creatinine, ALT, and AST concentrations were determined using an automatic
29 biochemical analyzer (Cobas 8000 C702, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Analyses were performed
30 using the specified kits from Roche Diagnostics.

31

32 **Liver oxidative damage markers**

33 As an index of protein oxidative damage, the carbonyl groups were determined as previously described¹. This
34 method is based on the reaction of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) with the protein carbonyl groups, and
35 the absorbance is read in a spectrophotometer at 370 nm. Lipoperoxidation was determined from the
36 quantification of TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) originated from reaction of TBA with
37 lipoperoxides in an acid-heating medium² (Draper et al. 1990). After precipitation with trichloroacetic acid 10%,
38 supernatant was mixed with 0.67% (1:1) and heated in a boiling water bath for 25 min. TBARS were
39 determined by the absorbance in a spectrophotometer at 532 nm.

40

41 **Serum cytokines and hormone levels**

42 Serum tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6, and IL-10 levels were determined with a rat ELISA kit
43 from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Levels of leptin and adiponectin were measured in fasting serum
44 with a rat ELISA kit from Millipore (Billerica, MA, USA).

45

46 **Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and N^ε-carboxymethyllysine**

47 Fasting blood glucose concentrations were determined by using a portable glucometer (Accucheck Active,
48 Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Fasting serum insulin concentrations were determined with an ultra-
49 sensitive rat insulin ELISA kit (Merckodia AB, Uppsala, Sweden). Insulin resistance (IR) was estimated
50 according to the homeostatic model assessment (HOMA) index using the following formula: fasting serum
51 insulin ($\mu\text{g/L}$) \times fasting plasma glucose (mg/dL)/405. Furthermore, N^ε-carboxymethyllysine was quantified by
52 indirect ELISA. In this analysis, serum was incubated in an ELISA plate and, after 24 h, the plates were washed
53 three times with Tween-Tris-buffered saline (TTBS, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 0.9% NaCl and
54 0.1% Tween-20). Subsequently, 200 μL of anti-N^ε-carboxymethyllysine (Abcam, Cambridge, MA, USA)
55 (1:1000) was added and incubated for 24 h at 4 °C. The plates were then washed three times with TTBS and
56 incubated with rabbit IgG peroxidase-linked secondary antibody (1:1000) for 2 h according to the
57 manufacturer's instructions. After washing the plate three times with TTBS, 100 μL of substrate solution (TMB
58 spectrophotometric ELISA detection kit) was added to each well and incubated for 10 min. The reaction was
59 stopped with 50 μL /well of 2 M sulfuric acid, and the plate read at 450 nm in a microplate reader.

60

61 **Mitochondrial DNA copy number**

62 Total were isolated from BAT with the QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the
63 manufacturer's instructions. DNA concentration was assessed with a BioPhotometer Plus (Eppendorf, Hamburg,
64 Germany). Mitochondrial DNA (mtDNA) and genomic DNA (gDNA) content was quantified using a
65 StepOnePlus™ real-time PCR system (Applied Biosystems, CA, USA). The content of cytochrome oxidase 2
66 (Cox2; single-copy mtDNA) were normalized to the content of fatty-acid synthase (Fasn; single-copy gDNA) to
67 evaluate the mitochondria number. Primer sequences were as follows:

68 Mt-Cox2: Forward GACGCCACATCACCTATCATAG; Reverse GGAGGGAAGGGCAATTAGAAT,

69 Fasn: Forward TGATCTACTCTAGGGAACGGG; Reverse CGGAGATGGGTAATGGTACAG.

70

71 **Western blotting**

72 For immunoblotting experiments, tissues were homogenized using a radioimmunoprecipitation assay (RIPA)
73 buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1 % IGEPAL® CA-630, 0.5% bile salt, 1
74 mM sodium orthovanadate, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 7.5) and protein lysates were clarified by
75 centrifugation. Protein concentrations were determined using BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific Pierce;
76 Rockford, IL, USA). Samples were denatured in 2× Laemmli buffer containing 10 % of 2-mercaptoethanol, and
77 heated at 95 °C for 5 min. A total of 20–30 µg/well of protein was loaded in polyacrylamide gel (8–12 % SDS-
78 PAGE), electrophoresed at 100 V and transferred to a nitrocellulose membranes (Hybond-ECL, GE Healthcare
79 Lifesciences) using a transfer tank (Bio-Rad, CA, USA). Protein loading and electroblotting efficiency were
80 verified through Ponceau S staining. After, membranes were washed in TTBS [100 mM Tris– HCl, pH 7.5, 137
81 mM NaCl, 0.1 % (v/v) Tween-20] and blocked in solution of TTBS with 5% (w/v) BSA for 2 hour at room
82 temperature. After, membranes were washed three times in TTBS and incubated overnight at 4°C with primary
83 antibodies in the dilution recommended by manufacturer. Antibodies used including: anti-AMPK (Abcam,
84 #ab80039), anti-phospho-AMPK (Abcam, #ab133448), anti-UCP1 (Thermo Fisher Scientific, #PA1-24894),
85 anti-Sirt1 (Cell Signaling, #9475), and anti-β-actin (Sigma, #A1978). Afterward, membranes were washed and
86 incubated with specie-specific HRP-conjugated secondary antibodies at 1:3000 in TTBS with 5 % BSA for 2 h
87 at room temperature. The immunoreactivity was detected by enhanced chemiluminescence using Supersignal
88 West Pico Chemiluminescent kit from Thermo Fisher Scientific (MA, USA). The chemiluminescence was
89 captured with an ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare; SP, Brazil). Densitometric analysis of the images were
90 performed using ImageJ software (ImageJ v1.49, National Institute of Health, USA).

91

92 **DNA extraction**

93 Fecal pellets were collected during the 16th week in aseptic conditions and stored at –80 °C for two months.
94 Microbial DNA extraction was performed using a QIAmp DNA stool mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)
95 following the manufacturer’s protocol, and the subsequent samples were stored at –20 °C for subsequent
96 analysis. Total extracted DNA was quantified with a Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
97 using a Qubit® dsDNA HS Assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). DNA purity was determined by
98 measuring the A260/280 ratio using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham,
99 MA, USA).

100

101 **Sequencing analysis**

102 The bacterial 16S rRNA hypervariable regions (V4) were amplified from the extracted DNA samples by
103 polymerase chain reaction (PCR) using 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) and 806R
104 (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) primers. In order to determine if contamination occurred during the
105 microbiome analysis, a sample devoid of any fecal content (blank) was included in the PCR run. The PCR
106 products were then purified, submitted to emulsion PCR, and sequenced on an Ion Torrent Personal Genome
107 Machine (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). All of the raw data was exported as a unique fastq file and
108 submitted to the Brazilian Microbiome Project (BMP) analysis pipeline³. The BMP pipeline utilizes different
109 scripts and software, such as QIIME and UPARSE, to evaluate the 16S rRNA phylogenetic profile. Briefly,
110 sequences were demultiplexed and filtered based upon size (200 bp) and quality scores. Operational taxonomic
111 units (OTUs) were clustered based on 97% similarity (at the species level) and then representative OTUs were
112 assigned to each phylogenetic identity using the Greengenes v. 13.8 database⁴. Differences in microbial
113 communities between groups were investigated using the STAMP software⁵. Alpha diversity was performed
114 with the respective QIIME scripts (alpha_diversity.py).

115

116 **Behavioral tests**

117 Behavioral tests were used for neurotoxicity screening. Behavioral tests were conducted at the light phase
118 (between 8:00 AM and 3:00 PM) in a homogeneously illuminated room (~70 lux) and were videotaped and
119 analyzed using the ANY-maze video tracking software, version 5.1 (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). This
120 software is an advanced video tracking system designed to provide an automated analysis in behavior test.

121

122 **Y-maze spontaneous alternation behavior (SAB):** SAB test was used as a measure of the working memory
123 (spatial short-term memory). This test was conducted two weeks before animals were euthanized. The Y-maze
124 apparatus consisted of three black arms in Y-shape (50 cm length×10 cm width×30 cm height). Each rat was
125 placed at the end of one arm, and then the rat exploration in the maze were recorded for 8 min using the ANY-
126 maze software. The sequence and total number of arms entered was recorded. Entry into an arm was considered
127 valid only when all four paws of the rat were inside that arm. Spontaneous alternation (%) was defined as
128 consecutive entries in 3 different arms (ABC), divided by the number of possible alternations (total arm entries
129 minus 2)⁶.

130

131 **Object recognition test (ORT):** The time of exploration of the novel object was used as a measure of the
132 working memory (4 h after training) and long-term memory (24 h after training). This test was conducted one
133 week before animals were euthanized. Open field box (black open-top cube 50×50×50 cm) was used for this
134 test. The objects to be discriminated were a Coca-Cola glass bottle (237 mL) as familiar object, Falcon tissue
135 culture flask (10 cm height) filled with water as 4 h-novel object, and cylinder plastic bottle (8 cm diameter and
136 10 cm height) as 24 h-novel object. ORT was divides in three session: habituation with apparatus,
137 familiarization with two identical objects, and test phase with two different objects (familiar and novel). Briefly,
138 rats were individually habituated during 5 min to the open field box shortly before to start ORT. After that, rats
139 were replaced in the open field apparatus and given 5 min to explore two objects that were placed at opposite
140 corners of the field (diagonal). Four and twenty four hours later the animals were re-exposed to one familiar
141 object (old object) together with a novel object (new object) for 5 min. After each session, the objects and box
142 were cleaned with 70% ethanol to minimize olfactory cues. The exploratory behavior to each object was
143 recorded in all sessions. The time of object exploration was measured with the ANY-maze software. The time of
144 exploration of the novel object was expressed as percent of the total exploration time of both objects^{7,8}.

145

146 **Open-field test (OFT):** The OFT was used here as a measure of emotional reactivity. OFT was conducted
147 during habituation phase of the ORT. All rats were individually tested in an open-field apparatus consisting of a
148 black open-top cube (50×50×50 cm). Each single rat was placed in the middle of the chamber, and then rat
149 activities were recorded for 5 min using the ANY-maze software. Total distance traveled was used as an index
150 of horizontal exploratory behavior, rearing behavior time was used as an index of vertical exploratory behavior,

151 total time in the center of apparatus was used as an index of anxiety-like behavior, and total time in freezing was
152 used as an index of behavioral inhibition (mutual activation of sympathetic and parasympathic nervous system).
153 Rats were considered to be freezing if no movement was detected for 3 s⁹.

154

155 **Molecular docking**

156 To estimate binding affinities for the compounds inspected in this work with AMPK, molecular docking was
157 performed in comparison with known activators of this protein. Rat and human AMPK structures were retrieved
158 from RCSB PDB (PDB ids 5UFU and 4ZHX, respectively)^{10,11}. Ligand structures were obtained from the same
159 databank via SMILES search. The docking calculations were carried out with DockThor version 2^{12,13}, under its
160 virtual screening protocol. Receptor and ligand molecules were prepared with dedicated tools from DockThor
161 server. The gridbox was defined using the binding sites for the activators present in the employed
162 crystallographic structures of AMPK. The box edges measured 22Å in all axes, with a discretization of 0.25Å.
163 The standard DockThor virtual screening setup was used (500000 evaluations, population size of 750, 12 runs).
164 Resulting conformers were clustered at 2Å of RMSD. Ligand-receptor contacts were evaluated with LigPlot
165^{14,15}.

166

167 **References**

- 168 1 Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG *et al.* Determination of Carbonyl
169 Content in Oxidatively Modified Proteins. *Methods Enzymol* 1990; **186**: 464–478.
- 170 2 Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods*
171 *Enzymol* 1990; **186**: 421–431.
- 172 3 Pylro VS, Roesch LFW, Morais DK, Clark IM, Hirsch PR, Tótola MR. Data analysis for 16S microbial
173 profiling from different benchtop sequencing platforms. *J Microbiol Methods* 2014; **107**: 30–37.
- 174 4 DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K *et al.* Greengenes, a chimera-
175 checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 2006;
176 **72**: 5069–5072.
- 177 5 Parks DH, Tyson GW, Hugenholtz P, Beiko RG. STAMP: statistical analysis of taxonomic and
178 functional profiles. *Bioinformatics* 2014; **30**: 3123–3124.
- 179 6 Wietrych M, Meziane H, Sutter a, Ghyselinck N, Chapman PF, Chambon P *et al.* Working memory
180 deficits in retinoid X receptor gamma-deficient mice. *Learn Mem* 2005; **12**: 318–326.

- 181 7 Leger M, Quiedeville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P *et al.* Object
182 recognition test in mice. *Nat Protoc* 2013; **8**: 2531–7.
- 183 8 Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1:
184 Behavioral data. *Behav Brain Res* 1988; **31**: 47–59.
- 185 9 Schnorr CE, Bittencourt L da S, Petiz LL, Gelain DP, Zeidán-Chuliá F, Moreira JCF. Chronic retinyl
186 palmitate supplementation to middle-aged Wistar rats disrupts the brain redox homeostasis and induces
187 changes in emotional behavior. *Mol Nutr Food Res* 2015; **59**: 979–990.
- 188 10 Cokorinos EC, Delmore J, Reyes AR, Albuquerque B, Kjøbsted R, Jørgensen NO *et al.* Activation of
189 Skeletal Muscle AMPK Promotes Glucose Disposal and Glucose Lowering in Non-human Primates and
190 Mice. *Cell Metab* 2017; **25**: 1147–1159.e10.
- 191 11 Langendorf CG, Ngoei KRW, Scott JW, Ling NXY, Issa SMA, Gorman MA *et al.* Structural basis of
192 allosteric and synergistic activation of AMPK by furan-2-phosphonic derivative C2 binding. *Nat*
193 *Commun* 2016; **7**: 10912.
- 194 12 de Magalhães CS, Almeida DM, Barbosa HJC, Dardenne LE. A dynamic niching genetic algorithm
195 strategy for docking highly flexible ligands. *Inf Sci (Ny)* 2014; **289**: 206–224.
- 196 13 de Magalhães CS, Barbosa HJC, Dardenne LE. Selection-Insertion Schemes in Genetic Algorithms for
197 the Flexible Ligand Docking Problem. In: *Genetic and Evolutionary Computation - GECCO 2004*.
198 2004, pp 368–379.
- 199 14 Laskowski RA, Swindells MB. LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug
200 Discovery. *J Chem Inf Model* 2011; **51**: 2778–2786.
- 201 15 Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of
202 protein-ligand interactions. *Protein Eng Des Sel* 1995; **8**: 127–134.
- 203

Supplementary Figures:

Figure S1

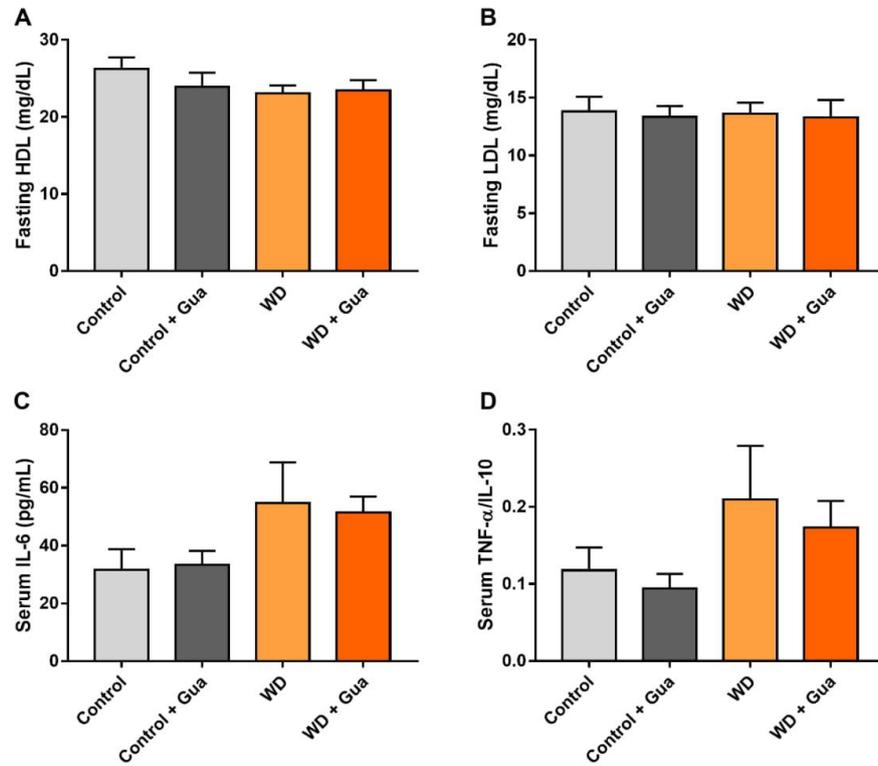


Figure S1 | Neither WD nor guarana had any effect on cholesterol or the inflammatory profile. (A) Fasting HDL (mg/dL). **(B)** Fasting LDL (mg/dL). **(C)** Serum IL-6 (pg/mL). **(D)** Serum TNF- α /IL-10 ration. Data are expressed as means \pm SEM. Significant differences ($n = 8$) are indicated by * $p < 0.05$ (ANOVA followed by Tukey between Control, WD, and WD + Gua groups).

Supplementary Tables

Supplementary Table S1: Diet Composition

	Diet components (g/Kg of chow)	Control	Western Diet
Protein	Soy protein	200	200
	Total	200	200
Lipids	Lard	0	180
	Soy oil	40	40
	Total	40	220
Carbohydrates	Corn starch	550	170
	Sucrose	100	300
	Fiber	50	25
	Total	700	495
Other components	Salt (sodium)	5.25 (2)	20 (7.86)
	Vitamin mix	10	10
	Mineral mix	40	40
	Choline ^a	2	2
	Methionine	3	3
	Lysine	3	3
	Cholesterol (mg) ^b	0	0.169
	Total (g)	998	989

^aCholine was added in the choline chloride form (52% purity).

^bThis cholesterol comes from the lard added to diets taking into account that 100 g of lard has 94 mg of cholesterol (no pure cholesterol was added).

Supplementary Table S2: Sources of Kcal in each diet.

Macronutrients	Control	Western Diet
Protein	21 %	17 %
Lipids	10 %	42.5 %
Carbohydrates	69 %	40.5 %
Total Kcal/Kg of chow	3760	4660

Supplementary Table 3: Interactions detected for the inspected ligands and rat AMPK.

Residue	Catechin	Epicatechin	Theobromine	Caffeine	Salicylate	PF-06409577	PF-249	PF-739
Val11 A	-	-	-	-	-	NB	NB	NB
Leu18 A	-	-	-	-	-	-	NB	NB
Gly19 A	-	-	-	-	-	-	NB	HB
Phe27 A	-	-	-	-	-	-	-	NB
Lys29 A	HB	HB	HB	HB	HB	HB	NB	NB
Lys31 A	NB	-	-	-	-	NB	NB	HB
Ile46 A	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Asn48 A	HB	HB	NB	NB	NB	NB	-	HB
Lys51 A	NB	HB	HB	HB	-	-	-	NB
Asp88 A	NB	-	NB	NB	NB	HB	HB	HB
Phe90 A	-	-	-	-	-	NB	-	-
Val81 B	NB	-	-	-	-	NB	-	NB
Arg83 B	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
Thr106 B	-	-	-	-	-	NB	-	NB
Arg107 B	-	-	-	-	-	NB	-	-
Asp108 B	-	-	-	-	-	NB	NB	NB
Asn111 B	NB	NB	-	-	NB	NB	NB	-
Val113 B	NB	-	-	-	-	NB	NB	NB
Ile115 B	-	-	-	-	-	-	-	NB

HB: hydrogen bond; NB: non-bonded contact (Van der Waals and hydrophobic interactions).

Supplementary Table 4: Interactions detected for the inspected ligands and human AMPK.

Residue	Catechin	Epicatechin	Theobromine	Caffeine	Salicylate	PF-06409577	PF-249	PF-739
Gly9 A	HB	-	-	-	-	-	-	-
Val11 A	NB	-	-	-	-	-	-	NB
Leu18 A	NB	-	-	-	-	-	-	NB
Gly19 A	-	-	-	-	-	-	-	NB
Gly28 A	-	NB	NB	NB	-	-	NB	-
Lys29 A	-	HB	HB	HB	HB	HB	HB	-
Lys31 A	NB	NB	-	-	HB	NB	HB	NB
Ile46 A	-	NB	HB	NB	-	NB	NB	NB
Asn48 A	-	-	NB	NB	-	NB	NB	NB
Lys51 A	-	HB	HB	HB	-	HB	NB	HB
Asp88 A	-	-	NB	-	-	-	-	-
Arg83 B	-	NB	-	-	-	NB	NB	NB
Thr106 B	HB	-	-	-	-	-	-	HB
Arg107	NB	-	-	-	-	-	-	NB
Sep108 B	HB	HB	-	-	HB	-	HB	NB
His109 B	HB	-	-	-	NB	HB	-	-
Asn111 B	HB	NB	-	-	HB	NB	HB	-
Val113 B	-	-	-	-	NB	NB	-	NB

HB: hydrogen bond; NB: non-bonded contact (Van der Waals and hydrophobic interactions).

PARTE III

4. DISCUSSÃO

A presente tese procura ampliar o conhecimento científico no campo de estudos de obesidade por apontar um modelo de dieta indutora de obesidade mais robusto do que os modelos clássicos de dieta, bem como por destacar o potencial antiobesidade de um produto brasileiro – o guaraná. A relevância do assunto está na alta prevalência da obesidade na população, na redução da qualidade de vida destes indivíduos e na falta de tratamentos seguros e eficientes (Bosello et al., 2016; Maffetone and Laursen, 2017). Diante das limitações dos modelos atuais para indução de obesidade, bem como a falta de padronização de dietas indutoras de obesidade nós entendemos que são necessários estudos que avancem na direção de uma dieta ideal. Da mesma forma, diante as limitações dos tratamentos atuais, são necessários estudos que apontem terapias alternativas, eficazes e seguras contra a obesidade com o intuito de fornecer melhor qualidade de vida a estes indivíduos.

Esta tese é composta por um artigo (Capítulo I) que compara três dietas obesogênicas quanto as disfunções associadas a obesidade e quanto as alterações na microbiota, e sugere a dieta mais adequada para estudos de obesidade e a dieta mais adequada para estudos de alimentos ultraprocessados. É composta ainda por um depósito de pedido patente de uma nova dieta indutora de obesidade, que vem como uma consequência do primeiro artigo e traz uma inovação tecnológica nesta área (Capítulo II). Por último, esta tese também apresenta outro artigo (Capítulo III) que descreve o potencial e um possível mecanismo antiobesidade do guaraná, juntamente com uma avaliação da toxicidade deste produto, sugerindo o guaraná como um novo agente terapêutico seguro no combate à obesidade.

4.1. Reprodutibilidade e escolha adequada da dieta controle: capítulo I

Tem se discutido muito na literatura científica a dificuldade de reproduzir resultados. Reiterando esta afirmação, saiu uma edição inteira, no mês de março de 2017, na *Animal Lab* (uma revista da *Nature Research*) sobre este tema. Em um dos artigos desta edição (Garner et al., 2017) os autores discutem de forma introdutória o que está sendo chamado de “*reproducibility crisis*”. Artigos anteriores, mas atuais, também tem discutido a baixa reprodutibilidade de muitos modelos (Casadevall and Fang, 2010; Collins and Tabak, 2014; Reardon, 2016; Servick, 2016) mostrando a importância que tem se dado a este tema. O primeiro artigo desta tese aborda modelos de dieta indutoras de obesidade. Neste artigo nós fazemos uma comparação entre duas dietas que já são utilizadas (dieta hiperlipídica, do inglês *high-fat diet – HFD*; e a dieta de cafeteria, do inglês *cafeteria diet – CAF*) e um protótipo de dieta proposto por nós tentando chegar mais próximo de uma dieta ocidental humana (do inglês *Western diet – WD*). A intenção deste trabalho era encontrar a dieta mais adequada para estudos de obesidade e incentivar o uso da mesma para que houvesse um aumento na reprodutibilidade nesta área de pesquisa, pois atualmente muitos tipos de dieta são utilizados, dificultando a comparação entre estudos. O que este trabalho nos revela não é apenas qual é o melhor modelo de dieta para o estudo da obesidade, mas também que os trabalhos com obesidade estão estudando os efeitos de cada uma das dietas e não da obesidade, uma vez que cada uma das dietas induz um fenótipo diferente nos animais. Acreditamos que este seja um dos principais achados do artigo, pois isto mostra um dos motivos pelos quais é difícil de reproduzir um experimento, principalmente em “estudos de obesidade”. Assim, este artigo nos mostra que os “estudos de obesidade” são na verdade estudos sobre o efeito de dietas específicas. Como podemos encontrar medidas terapêuticas para a obesidade se para cada dieta testada com a mesma medida terapêutica o resultado for diferente?

A dieta proposta por nós neste primeiro artigo é um protótipo de dieta, o que significa que ela ainda pode ser mudada para se tornar ainda mais eficiente e parecida com a dieta ocidental humana. Como exemplo, poderíamos aumentar a quantidade de colesterol, a qual está abaixo do consumo ocidental humano na nossa dieta proposta (USDA, 2012). Outro ingrediente que tem invadido produtos industrializados é a frutose, a qual pode levar a síndrome metabólica (Mamikutty et al., 2014). Como a frutose e o colesterol vários outros compostos estão tendo seu consumo aumentado em sociedades ocidentais, e por isso seria interessante (como uma perspectiva) testar uma dieta que seja ainda mais parecida com a dieta ocidental humana.

Um fato chamou a nossa atenção neste primeiro artigo: os animais que consumiram as dietas mais utilizadas para induzir a obesidade em modelos de roedores (*HFD* e *CAF*), não ganharam peso em relação à dieta controle usada por nós. Levantamos algumas hipóteses que podem explicar este desfecho. 1) Alguns trabalhos mostram a ineficiência das dietas *HFD* e *CAF* em induzir ganho de peso aos animais (Higa et al., 2014; Sampey et al., 2011). 2) A dieta de cafeteria é muito pouco padronizada e pode gerar resultados de ganho de peso diferentes conforme a escolha dos alimentos, como podemos observar quando comparamos os trabalhos de Higa et al. (2014) e Soares et al. (2017). 3) As vezes, a falta de diferença no peso dos animais pode ser devido a escolha do grupo controle. Existem duas dietas comumente utilizadas como controle. Uma destas é uma ração padrão feita a base de grãos (produtos não refinados) (conhecido em inglês com *Standard Chow*, *Unpurified Diet* ou *Grain-based Diet*) que pode ser visualizada na Figura 1A. A outra é uma ração com baixo conteúdo de gordura feita com produtos refinados, geralmente contendo a mesma base nutricional da dieta obesogênica utilizada (conhecida em inglês como *refined low-fat diet – rLFD*) e pode ser visualizada na Figura 1B. Há uma grande

diferença entre elas, por exemplo tem sido mostrado que os animais que consomem uma *rLFD* (utilizada neste trabalho) ganham bem mais peso do que os animais que consomem uma ração padrão baseada em grãos (Chassaing et al., 2015; Sampey et al., 2011).

O baixo ganho de peso dos animais que consumiram a *HFD* em nosso primeiro artigo pode englobar estas três possibilidades citadas acima, pois uma não exclui a outra. Porém, aqui nesta tese eu gostaria de discutir a terceira por não ter sido tão abordada no artigo e porque a discussão sobre a escolha de uma dieta controle adequada tem começado a aparecer nos artigos recentemente (Dalby et al., 2017; Pellizzon and Ricci, 2018). Como discutem Dalby et al. (2017) e Pellizzon e Ricci (2018), a maioria dos pesquisadores que avaliam o efeito de dietas obesogênicas, as quais são (na maioria dos casos) feitas com produtos refinados, comparam estas dietas com uma dieta controle feita com produtos não refinados (ração padrão baseada em grãos). Tal comparação entre dois tipos de dieta completamente diferentes torna impossível tirar conclusões sobre as diferenças fenotípicas conduzidas pela dieta.

Para discutir melhor o tema é necessário destacar as diferenças que poderiam confundir a interpretação de resultados. A ração padrão baseada em grãos é composta, geralmente, por três grãos integrais: milho, aveia e trigo (Figura 3A). Este tipo de ração ainda pode incluir farelo de alfafa, ração para peixe, levedura de cerveja, conservantes, e um adicional de vitaminas e minerais que, na maioria dos casos, não leva em consideração o que já está presente nos grãos integrais acrescentados (Pellizzon and Ricci, 2018). Por outro lado, as rações purificadas (*rLFD* e a maioria das *refined high-fat diet - rHFD*) são feitas com ingredientes refinados tais como caseína, proteína isolada de soja, amido de milho, sacarose, celulose, e óleos refinados, os quais contém um nutriente principal e pouquíssimo de outros nutrientes e não-nutrientes (Figura 3B).

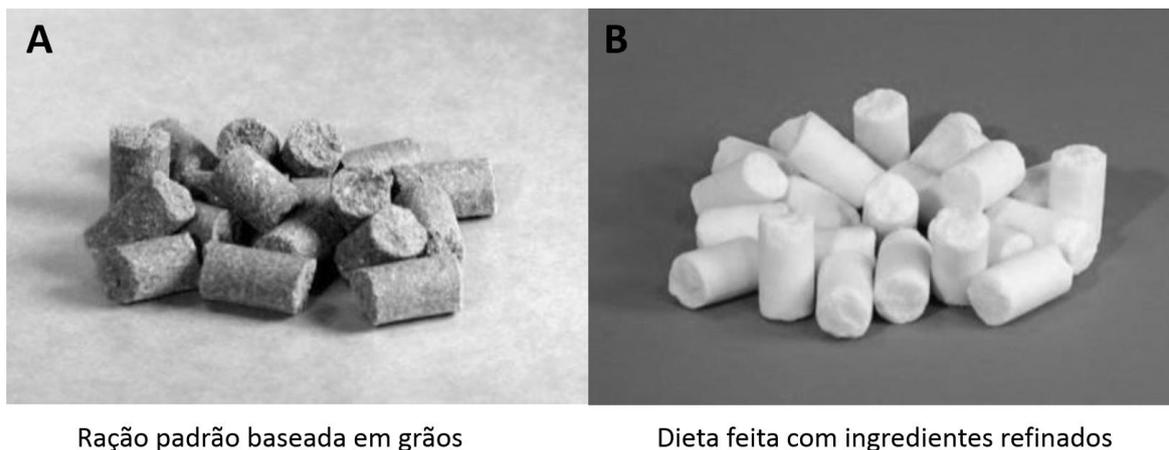


Figura 3: A esquerda uma *ração padrão baseada em grãos* e a direita um dieta purificada que pode ser tanto uma *low-fat diet* (dieta pobre em gordura) quanto uma *high-fat diet* (dieta rica em gordura). [Imagem reproduzida e adaptada de Pellizzon e Ricci, 2017].

Parece claro que comparar uma *rHFD* com uma *rLFD* é mais adequado que comparar com uma ração padrão baseada em grãos. Porém, Warden e Fisler (2008), ao revisarem artigos que comparavam dietas publicados em 5 revistas de alto impacto, verificaram que apenas 14% dos artigos compararam dietas usando os mesmos nutrientes variando apenas na quantidade de carboidrato e gordura. Em 9% dos artigos foram usados dois tipos de dieta como controle – a ração padrão baseada em grãos e a *rLFD*. Já em 43% dos artigos compararam inapropriadamente uma dieta purificada com uma ração padrão baseada em grãos, e em 34% os dados foram insuficientes. Pellizzon e Ricci (2018) reavaliaram esses números com artigos publicados em 2016 e encontraram que em 19% dos artigos foram comparadas dietas contendo a mesma base nutricional. Esse número aumentou, mas ainda é baixo. Assim, é possível que os pesquisadores atribuam diferenças fenotípicas em animais alimentados com uma ração padrão baseada em grãos ou *rHFD* às diferenças na quantidade de gordura (ou ao desfecho obeso), quando, de fato, elas podem ser devido a inúmeras outras diferenças nutricionais entre as dietas.

Para exemplificar o grande problema que isto gera, eu destaco aqui um trabalho realizado por Dalby e colaboradores (2017) que pretende mudar a ideia que se tem da relação causal entre obesidade e microbiota intestinal. Há muito tempo pesquisadores vem mostrando uma grande alteração na microbiota intestinal de ratos obesos. Porém na maioria das vezes a comparação é feita com uma dieta controle inapropriada. No trabalho de Dalby e colaboradores (2017), ele mostrou que camundongos obesos por consumirem uma *rHFD* apresentam uma grande diferença na microbiota intestinal quando comparado com os animais que consumiram uma ração padrão baseada em grãos, mas quando comparada com os que consumiram uma *rLFD* contendo a mesma base nutricional da *rHFD* essa diferença foi perdida. Ou seja, ele mostrou que a obesidade é independente de uma grande alteração na microbiota intestinal, diferente do que vinha sendo discutido na literatura. Este resultado também pode ser visto no nosso primeiro artigo (publicado antes que o trabalho de Dalby citado acima) onde há apenas uma pequena alteração na microbiota intestinal entre os animais que consumiram a *LFD* e os que consumiram a *HFD* ou a *WD*. O resultado obtido por Dalby e colaboradores (2017) mostra que deve ter um componente presente na ração padrão baseada em grãos que causa esta diferença, a qual também pode ser vista a nível morfológico no ceco e cólon (Figura 4).

Já há bastante tempo é conhecido o potencial das fibras em alterar a microbiota intestinal e reduzir o peso (Kuo, 2013; Slavin, 2005). Chassaing e colaboradores (2017, 2015) apontam a quantidade e o tipo de fibras como os maiores causadores destas diferenças. Segundo Pellizzon e Ricci (2018) uma *rLFD* tem aproximadamente 5% de fibras (fibras insolúveis apenas) enquanto uma ração padrão baseada em grãos pode chegar a ter 25% (fibras solúveis e insolúveis). Isto sugere que as fibras presentes na ração padrão a base de grãos podem ser responsáveis pela alteração na microbiota, observada quando esta é comparada com uma *rHFD*, antes associada à obesidade. Portanto, quando se estuda a

obesidade, quanto mais fatores se alteram entre uma dieta e outra mais difícil se torna a interpretação dos resultados. Toda essa discussão em conjunto mostra a importância da escolha da dieta controle, que também está relacionada com o tema da reprodutibilidade discutido anteriormente.

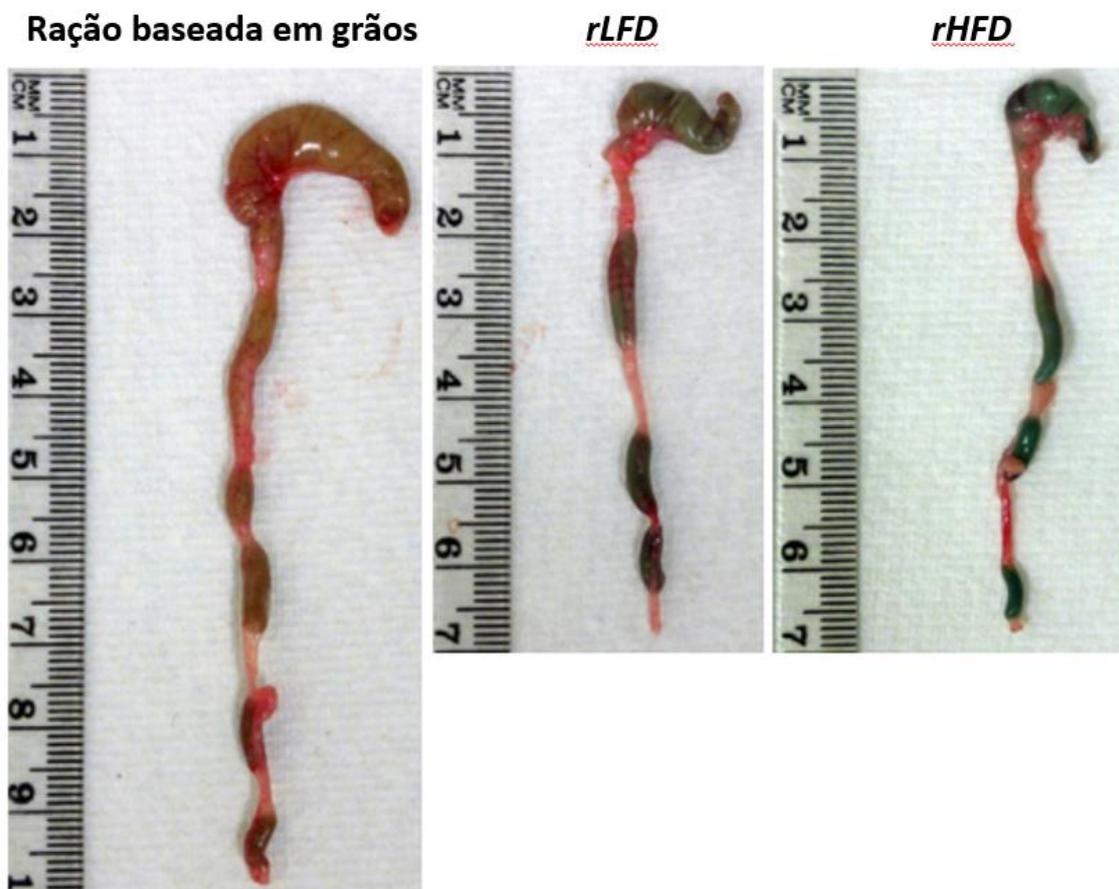


Figura 4: Imagem mostrando a diferença morfológica do ceco e do cólon de animais que comeram uma ração padrão baseada em grãos (esquerda), uma *rLFD* (meio) e uma *rHFD* (direita). [Imagem reproduzida e adaptada de Dalby et al., 2017]

Dentre os resultados mais importantes do primeiro artigo podemos apontar 1) uma dieta pobre em fibras e rica em gordura, açúcar e sal é mais eficiente em induzir a obesidade e

suas disfunções quando comparada com duas dietas clássicas – dieta hiperlipídica e dieta de cafeteria. 2) Mostramos também que a microbiota intestinal, a qual é necessária para a saúde do hospedeiro, é muito mais sensível a uma dieta rica em alimentos ultra-processados do que a uma dieta rica em gordura ou uma dieta tipo ocidental. Discutimos que isso deve estar relacionado com a alta quantidade de conservantes (inibidores de crescimento bacteriano) ou outros aditivos alimentares que nós identificamos nesses alimentos. 3) A dieta *HFD* não induziu a obesidade, provavelmente porque foi comparada com uma dieta contendo a mesma base nutricional que ela, diferente do que se costuma observar na literatura científica da área. 4) A obesidade não leva a uma grande alteração na microbiota intestinal. Diferente do que vinha sendo sugerido na literatura científica. Isto sugere, portanto, que devemos investigar os efeitos da obesidade sobre a microbiota em níveis mais específicos tais como gênero e espécie.

Estes achados em conjunto irão auxiliar pesquisadores a escolher a dieta mais adequada para compor o seu desenho experimental. Pudemos concluir que cada dieta serve para investigar um fator ou um defeito específico e que nem todas podem ser usadas para se estudar a obesidade. Por exemplo, a dieta hiperlipídica deve ser usada para investigar os efeitos de uma dieta rica em gordura e se caso os animais ficarem obesos então é possível estudar a obesidade induzida pelo excesso de gordura na dieta. A dieta de cafeteria deve ser usada para investigar os efeitos de uma dieta rica em alimentos ultra-processados e/ou os efeitos da obesidade induzida por alimentos ultra-processados. Da mesma forma, a dieta tipo ocidental deve ser usada para investigar os efeitos de uma dieta ocidental humana e/ou estudar os efeitos da obesidade induzida pela dieta ocidental.

Outra contribuição importante do primeiro artigo é a discussão sobre os possíveis efeitos deletérios dos aditivos alimentares na dieta sobre a microbiota intestinal, os quais são pouco estudados ainda. Na dieta de cafeteria utilizada por nós foram identificados 17

aditivos alimentares diferentes dentre eles corantes, flavorizantes, conservantes, emulsificantes e estabilizantes. Nós acreditamos que estes aditivos alimentares sejam, pelo menos em parte, responsáveis pela severa disbiose vista no intestino dos animais que consumiram a dieta de cafeteria. Dentre esses aditivos, nós acreditamos que os conservantes sejam os principais causadores da disbiose, pois são, por natureza, inibidores de crescimento bacteriano. Portanto, conservantes poderiam impedir o crescimento da grande maioria das bactérias e favorecendo o crescimento de poucas bactérias resistentes, dessa forma diminuindo a diversidade bacteriana. Uma das principais características da disbiose causada pela dieta de cafeteria foi a enorme redução na diversidade bacteriana do intestino dos animais, pois, como discutido na introdução desta tese, a diversidade bacteriana é um dos principais fatores para determinar a saúde da microbiota intestinal (Sonnenburg and Bäckhed, 2016). Corroborando com nossos dados, um estudo mostrou que uma diminuição da diversidade da microbiota intestinal está associada a hábitos não saudáveis, tais como o consumo de refrigerantes, salgadinhos e alto consumo de Kcal (Zhernakova et al., 2016). Para finalizar, alimentos ultra-processados geralmente apresentam mais de um destes aditivos concomitantemente. Dificilmente encontramos na literatura científica trabalhos investigando os efeitos desses aditivos alimentares em conjunto. Portanto, são necessários estudos que avaliem o efeito destes aditivos em conjunto, que é a forma que eles se apresentam nos alimentos.

4.2. Importância da patente e potencial comercial da dieta: Capítulo II

Não temos no Brasil uma forte interação entre ciência e tecnologia dentro das universidades. Locais onde essa interação é mais forte pesquisadores transitam entre produção de patentes e de artigos científicos. A importância da produção de artigos científicos para a expansão do conhecimento é incontestável, enquanto as patentes têm

sua importância como fonte geradora de informação tecnológica, a qual é de grande relevância para o desenvolvimento social e econômico de um país e como fonte alternativa de captação de recursos pela universidade (Moura et al., 2005). Nesse contexto, deve-se reconhecer que os documentos de patentes são fontes riquíssimas de informações. Contudo, o uso dessas informações ainda é insipiente no Brasil, mesmo nas universidades (Brandão, 2016).

Dado o potencial inventivo da dieta desenvolvida, nós buscamos a produção desses dois tipos de documento na intenção de expandir o conhecimento científico e tecnológico. Assim, baseado nos dados do primeiro artigo desta tese, nós fizemos um pedido de patente, o qual está depositado com o número BR10.2018.000453-0. A invenção descreve uma nova dieta indutora de obesidade, a qual buscou uma maior similaridade com a dieta ocidental humana em relação a quatro itens (gordura, açúcar, fibra e sal). Assim, esta dieta apresenta uma maior quantidade de gordura, sacarose e sal e uma menor quantidade de fibras.

Há diversas patentes de composição de dieta utilizadas para induzir disfunções específicas. Muitas destas composições patenteadas apresentam grandes quantidades de gordura e sacarose, e em diversas proporções, mas nenhuma dessas dietas possuem alterações na quantidade de fibras e sal como na presente invenção. O sal é relevante para aumentar a palatabilidade da dieta, a qual está associada a hiperfagia que por sua vez está associada à obesidade (Berthoud and Zheng, 2012; Cocores and Gold, 2009). As fibras por sua vez são relacionadas a redução de peso e a observada redução de fibras na população pode estar por trás da crescente epidemia de obesidade (Slavin, 2005). Além disso, estes dois nutrientes foram alterados na dieta baseado no consumo humano destes nutrientes, assim tornando ela mais similar a dieta ocidental humana. Vale ressaltar que não foi encontrado nenhuma patente de um produto para indução de obesidade que fosse

unicamente uma dieta. Assim, a composição da dieta revelada na patente BR10.2018.000453-0 é única e se diferencia dos documentos anteriores encontrados.

Não há uma dieta ideal para a indução da obesidade (Buettner et al., 2007), assim esta nova dieta tenta resolver diversos problemas presentes nessas dietas já existentes na intenção de avançar em direção a uma dieta ideal. De uma forma mais específica, a nova dieta resolve os problemas de baixa eficiência em induzir obesidade e disfunções associadas a obesidade, de baixa palatabilidade e de baixa similaridade com a dieta ocidental humana presentes na dieta rica em gordura. Bem como, resolve os problemas de baixa padronização, de níveis inadequados de vitaminas, proteínas e minerais, e da presença de aditivos alimentares encontrados na dieta de cafeteria.

Há muitas empresas que produzem rações animais para serem usadas na pesquisa. Muitas dessas rações são usadas para indução de obesidade. As empresas **Prag Soluções**, **Envigo** e **Research Diets** comercializam várias dietas para a indução da obesidade, em que estas dietas se diferenciam entre si pela quantidade de gordura, açúcar e colesterol, bem como pelo tipo de gordura, entretanto nenhuma delas apresenta alteração na quantidade de fibras e de sal como na presente invenção. Portanto a dieta proposta apresenta alto potencial de comercialização. Vale a pena ressaltar que estas empresas comercializam estas dietas para todas as espécies/linhagens de roedores e a presente invenção foi testada apenas em ratos da linhagem Wistar. Por fim, a patente reivindica principalmente a composição e o uso desta composição de uma dieta indutora de obesidade.

4.3. Segurança da utilização do guaraná em pó: Capítulo III

No Artigo II desta tese nós apontamos o guaraná como um agente seguro para tratar a obesidade com base em vários dados toxicológicos. Porém, aqui eu gostaria de levantar uma discussão sobre os possíveis efeitos adversos de um consumo excessivo do guaraná.

A semente do guaraná possui uma concentração muito alta de cafeína, podendo chegar a 6%, que é 2 a 5 vezes mais do que se encontra nas sementes do café Arábico (Schimpl et al., 2013). Esse composto tem potencial estimulatório do metabolismo podendo ser tóxico em grandes quantidades (Hursel and Westerterp-Plantenga, 2010). Em adultos a dose letal da cafeína é estimada em 5-10 g por dia, que é equivalente a 75 xícaras de café. Porém, indivíduos que ingeriram 400 mg de cafeína (~3-6 xícaras) ou mais já mostram efeitos adversos tais como aumento na pressão arterial, palpitação, ansiedade, dor de cabeça, inquietação e tontura, quando comparado com o grupo placebo (Astrup et al., 1990). Além da cafeína o guaraná contém outras metilxantinas, tais como teofilina e teobromina, as quais tem sido associadas a convulsões em pacientes sem epilepsia e a exacerbação de convulsão em pacientes com epilepsia (Boison, 2011; Schimpl et al., 2013).

No segundo artigo (capítulo II) utilizamos um guaraná em pó da marca Lifar Sanitas (Porto Alegre, RS, Brasil) que contem cerca de 3,5% de cafeína. Segundo o vendedor para reduzir a fadiga motora e psíquica é indicado consumir cerca de 1 g de guaraná em pó três vezes ao dia, totalizando entre 100 e 120 mg de cafeína (dependendo do lote). A ingestão desta dosagem está dentro do limite recomendado pela *European Food and Safety Authority*, que é de 3 mg/Kg/dia (210 mg para um indivíduo de 70 Kg) (Temple et al., 2017). Porém é facilmente ultrapassada com a adição de um xícara de café de 150 ml, a qual contém em média 90 mg (Temple et al., 2017).

Apesar de mortes por ingestão excessiva de cafeína serem raras, um número alto de hospitalizações tem sido registrado. Mais especificamente 79.438 entre 2005 e 2011 (Temple et al., 2017). O consumo excessivo geralmente é feito através de pílulas (Temple et al., 2017) e estimulantes muito provavelmente por falta de conscientização do potencial tóxico do consumo excessivo. Portanto, apesar de compostos contendo cafeína, bem

como outras metilxantinas, serem seguros quando o consumo moderado, uma mensagem de alerta nos rótulos desses produtos seria adequada.

Dentre os resultados mais importantes do primeiro artigo podemos apontar 1) guaraná impediu ganho de peso, resistência à insulina e desbalanço das adipocinas induzidos pela dieta tipo ocidental. 2) Guaraná levou a ativação do tecido adiposo marrom. 3) Guaraná causou apenas uma pequena alteração na microbiota intestinal. 4) Sugerimos por *docking* molecular que quatro compostos presentes no guaraná poderiam ativar diretamente a AMPK. 5) Nós mostramos que a dose e forma de administração utilizado por nós foi segura e a partir disso estimamos a dose humana equivalente que foi corrigida ainda por um fator de segurança de 10.

O segundo artigo mostra como produtos derivados de plantas podem ser bons alvos de investigação no combater à obesidade. Em conjunto, os achados deste artigo destacam a importância de investigar os efeitos adversos dos produtos derivados de plantas, por mais seguros que possam parecer. Além disso, o artigo também mostra também o uso da bioinformática como uma ferramenta alternativa para explorar mecanismos de ação.

5. CONCLUSÃO

5.1. Conclusão geral

Estes dois trabalhos junto trazem novas perspectivas para quem trabalha com obesidade. Além disso, eles trazem muita informação acerca do fenótipo metabólico e alteração na microbiota induzido pelas dietas ou pelo guaraná. No segundo artigo utilizamos, ainda, ferramentas de bioinformática para ajudar a hipotetizar um dos mecanismos de ação do guaraná.

5.2. Conclusões específicas

- As três dietas obesogênicas estudadas tem respostas diferentes entre si, sugerindo que são modelos diferentes e que, portanto, devem ser utilizadas para investigar objetivos diferentes. Além disso, a dieta ocidental (desenvolvida por nós) foi, dentre as três dietas, o modelo mais robusto para estudar obesidade, enquanto que a dieta hiperlipídica pode ser um bom modelo para se investigar o excesso de gordura na dieta, e a dieta de cafeteria poderia ser usada para investigar o efeito do excesso de ultra-processados na dieta (Capítulo I).

- Redigimos um pedido de patente a partir da dieta desenvolvida por nós (Capítulo II).

- O guaraná em pó tem potencial como agente terapêutico no combate contra a obesidade. Mostrou-se seguro na dose e forma de administração utilizados. Mostramos, também, um possível mecanismo antiobesidade do guaraná através da ativação do tecido adiposo marrom (mitogênese, aumento de UCP e expansão do tecido adiposo marrom). Por último, nós mostramos, através de *docking* molecular, que parte da ativação pode ter sido via ativação direta da AMPK (Capítulo III).

6. PERSPECTIVAS

I. Aprimorar a dieta tipo ocidental com base no consumo ocidental humano de componentes da dieta que vem sendo associados a disfunções metabólicas como colesterol, xarope de milho e óleos refinados.

II. Comparar as dietas utilizadas no Artigo I na linhagem de camundongo C57BL/6, o qual é o organismo mais utilizado em estudos de obesidade e que responde, aparentemente, bem a dieta hiperlipídica.

III. Investigar os efeitos dos aditivos alimentares de forma mais controlada, como por exemplo adicionando estes a uma ração padrão definida, a qual também deve ser usada no grupo controle.

IV. Fazer um ensaio clínico em pacientes obesos com o guaraná na dose sugerida no Artigo II.

V. Compreender melhor os mecanismos antiobesidade do guaraná explorando melhor a via avaliada no Artigo II e explorando vias não avaliadas como, por exemplo, a liberação de catecolaminas, e inibição da fosfodiesterase e da catechol O-methyl- transferase.

VI. Testar se a cafeína, teobromina, catequina e epicatequina são capazes de ativar diretamente a AMPK como sugerido pelo docking molecular.

7. REFERÊNCIAS

- Alam, I., Ng, T.P., Larbi, A., 2012. Does Inflammation Determine Whether Obesity Is Metabolically Healthy or Unhealthy? The Aging Perspective. *Mediators Inflamm.* 2012, 1–14. doi:10.1155/2012/456456
- Andersen, T., Fogh, J., 2001. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. *J. Hum. Nutr. Diet.* 14, 243–250. doi:10.1046/j.1365-277X.2001.00290.x
- Astrup, A., Toubro, S., Cannon, S., Hein, P., Breum, L., Madsen, J., 1990. Caffeine: a double-blind, placebo-controlled study of its thermogenic, metabolic, and cardiovascular effects in healthy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* 51, 759–767. doi:10.1093/ajcn/51.5.759
- Bäckhed, F., 2009. Changes in Intestinal Microflora in Obesity: Cause or Consequence? *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 48, S56–S57. doi:10.1097/MPG.0b013e3181a11851
- Baghkhani, L., Jafari, M., 2002. Cardiovascular adverse reactions associated with guarana. *J. Herb. Pharmacother.* 2, 57–61. doi:10.1300/J157v02n01_08
- Barrett, P., Mercer, J.G., Morgan, P.J., 2016. Preclinical models for obesity research. *Dis. Model. Mech.* 9, 1245–1255. doi:10.1242/dmm.026443
- Benton, D., 2015. Portion Size: What We Know and What We Need to Know. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55, 988–1004. doi:10.1080/10408398.2012.679980
- Berthoud, H.R., Zheng, H., 2012. Modulation of taste responsiveness and food preference by obesity and weight loss. *Physiol. Behav.* 107, 527–532. doi:10.1016/j.physbeh.2012.04.004
- Bittencourt, L. da S., Zeidán-Chuliá, F., Yatsu, F.K.J., Schnorr, C.E., Moresco, K.S., Kolling, E.A., Gelain, D.P., Bassani, V.L., Moreira, J.C.F., 2014. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) prevents β -amyloid aggregation, generation of advanced glycation-end products (AGEs), and acrolein-induced cytotoxicity on human neuronal-like cells. *Phyther. Res.* 28, 1615–1624. doi:10.1002/ptr.5173
- Blanck, H.M., Serdula, M.K., Gillespie, C., Galuska, D.A., Sharpe, P.A., Conway, J.M.,

- Khan, L.K., Ainsworth, B.E., 2007. Use of nonprescription dietary supplements for weight loss is common among Americans. *J. Am. Diet. Assoc.* 107, 441–447. doi:10.1016/j.jada.2006.12.009
- Boison, D., 2011. Methylxanthines, Seizures, and Excitotoxicity. pp. 251–266. doi:10.1007/978-3-642-13443-2_9
- Bondia-Pons, I., Ryan, L., Martinez, J.A., 2012. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J. Physiol. Biochem.* 68, 701–11. doi:10.1007/s13105-012-0154-2
- Boozer, C.N., Nasser, J. a, Heymsfield, S.B., Wang, V., Chen, G., Solomon, J.L., 2001. An herbal supplement containing Ma Huang-Guarana for weight loss: a randomized, double-blind trial. *Int. J. Obes.* 25, 316–324. doi:10.1038/sj.ijo.0801539
- Bortolin, R.C., Vargas, A.R., Gasparotto, J., Chaves, P.R., Schnorr, C.E., Martinello, K.B., Silveira, A.K., Rabelo, T.K., Gelain, D.P., Moreira, J.C.F., 2017. 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.* 1–30. doi:10.1038/ijo.2017.225
- Bosello, O., Donataccio, M.P., Cuzzolaro, M., 2016. Obesity or obesities? Controversies on the association between body mass index and premature mortality. *Eat. Weight Disord. - Stud. Anorexia, Bulim. Obes.* 21, 165–174. doi:10.1007/s40519-016-0278-4
- Boulangé, C.L., Neves, A.L., Chilloux, J., Nicholson, J.K., Dumas, M.-E., 2016. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Med.* 8, 42. doi:10.1186/s13073-016-0303-2
- Brandão, F.G., 2016. Democratização da informação a partir do uso de Repositórios Digitais Institucionais: da comunicação científica às informações tecnológicas de patentes.
- Brown, K., DeCoffe, D., Molcan, E., Gibson, D.L., 2012. Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. *Nutrients* 4, 1095–1119. doi:10.3390/nu4081095

- Buettner, R., Schölmerich, J., Bollheimer, L.C., 2007. High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* 15, 798–808.
doi:10.1038/oby.2007.608
- Casadevall, A., Fang, F.C., 2010. Reproducible science. *Infect. Immun.* 78, 4972–4975.
doi:10.1128/IAI.00908-10
- Chassaing, B., Miles-Brown, J., Pellizzon, M., Ulman, E., Ricci, M., Zhang, L., Patterson, A.D., Vijay-Kumar, M., Gewirtz, A.T., 2015. Lack of soluble fiber drives diet-induced adiposity in mice. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 309, G528–G541. doi:10.1152/ajpgi.00172.2015
- Chassaing, B., Vijay-Kumar, M., Gewirtz, A.T., 2017. How diet can impact gut microbiota to promote or endanger health. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 33, 417–421.
doi:10.1097/MOG.0000000000000401
- Chung, H.Y., Cesari, M., Anton, S., Marzetti, E., Giovannini, S., Seo, A.Y., Carter, C., Yu, B.P., Leeuwenburgh, C., 2009. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* 8, 18–30.
doi:10.1016/j.arr.2008.07.002
- Clarke, G., Stilling, R.M., Kennedy, P.J., Stanton, C., Cryan, J.F., Dinan, T.G., 2014. Minireview: Gut Microbiota: The Neglected Endocrine Organ. *Mol. Endocrinol.* 28, 1221–1238. doi:10.1210/me.2014-1108
- Cocores, J. a., Gold, M.S., 2009. The Salted Food Addiction Hypothesis may explain overeating and the obesity epidemic. *Med. Hypotheses* 73, 892–899.
doi:10.1016/j.mehy.2009.06.049
- Collins, F.S., Tabak, L.A., 2014. NIH plans to enhance reproducibility. *Nature* 505, 612–613. doi:10.1038/505612a
- Cordain, L., Eaton, S.B., Sebastian, A., Mann, N., Lindeberg, S., Watkins, B.A., O’Keefe, J.H., Brand-Miller, J., 2005. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 341–354.
- Costa Krewer, C., Ribeiro, E.E., Ribeiro, E.A.M., Moresco, R.N., Ugalde Marques da Rocha, M.I., Santos Montagner, G.F.F., Machado, M.M., Viegas, K., Brito, E., Cruz, I.B.M., 2011. Habitual intake of guaraná and metabolic morbidities: An

- epidemiological study of an elderly Amazonian population. *Phyther. Res.* 25, 1367–1374. doi:10.1002/ptr.3437
- Dalby, M.J., Ross, A.W., Walker, A.W., Morgan, P.J., 2017. Dietary Uncoupling of Gut Microbiota and Energy Harvesting from Obesity and Glucose Tolerance in Mice. *Cell Rep.* 21, 1521–1533. doi:10.1016/j.celrep.2017.10.056
- Davis, R.A.H., Plaisance, E.P., Allison, D.B., 2018. Complementary Hypotheses on Contributors to the Obesity Epidemic 26, 17–21. doi:10.1002/oby.22071
- DeGruttola, A.K., Low, D., Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., 2016. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflamm. Bowel Dis.* 22, 1137–1150. doi:10.1097/MIB.0000000000000750
- Duca, F. a, Lam, T.K.T., 2014. Gut microbiota, nutrient sensing and energy balance. *Diabetes, Obes. Metab.* 16, 68–76. doi:10.1111/dom.12340
- Duranti, S., Ferrario, C., van Sinderen, D., Ventura, M., Turrone, F., 2017. Obesity and microbiota: an example of an intricate relationship. *Genes Nutr.* 12, 18. doi:10.1186/s12263-017-0566-2
- Ekor, M., 2014. The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front. Neurol.* 4 JAN, 1–10. doi:10.3389/fphar.2013.00177
- Garner, J.P., Gaskill, B.N., Weber, E.M., Ahloy-Dallaire, J., Pritchett-Corning, K.R., 2017. Introducing Therioepistemology: the study of how knowledge is gained from animal research. *Lab Anim. (NY)*. 46, 103–113. doi:10.1038/labam.1224
- Gérard, P., 2016. Gut microbiota and obesity. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 147–162. doi:10.1007/s00018-015-2061-5
- González-Muniesa, P., Martínez-González, M.-A., Hu, F.B., Després, J.-P., Matsuzawa, Y., Loos, R.J.F., Moreno, L.A., Bray, G.A., Martinez, J.A., 2017. Obesity. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 3, 17034. doi:10.1038/nrdp.2017.34
- Hall, K.D., 2018. Did the Food Environment Cause the Obesity Epidemic ? *Obesity* 26, 2017–2019. doi:10.1002/oby.22073
- Harakeh, S.M., Khan, I., Kumosani, T., Barbour, E., Almasaudi, S.B., Bahijri, S.M.,

- Alfadul, S.M., Ajabnoor, G.M.A., Azhar, E.I., 2016. Gut Microbiota: A Contributing Factor to Obesity. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6, 1–11. doi:10.3389/fcimb.2016.00095
- Haslam, D.W., James, W.P.T., 2005. Obesity. *Lancet* 366, 1197–1209. doi:10.1016/S0140-6736(05)67483-1
- Higa, T.S., Spinola, A. V, Fonseca-Alaniz, M.H., Evangelista, F.S.A., 2014. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 6, 47–54.
- Hill, J.O., 2006. Understanding and Addressing the Epidemic of Obesity: An Energy Balance Perspective. *Endocr. Rev.* 27, 750–761. doi:10.1210/er.2006-0032
- Hill, J.O., Melanson, E., 1999. Overview of the determinants of overweight and obesity: current evidence and research issues. *Med. Sci. Sport. Exerc.* 31, S515. doi:10.1097/00005768-199911001-00005
- Hursel, R., Westerterp-Plantenga, M.S., 2010. Thermogenic ingredients and body weight regulation. *Int. J. Obes.* 34, 659–669. doi:10.1038/ijo.2009.299
- Instituto Nacional de Geografia e Estatística (IBGE), 2009. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009 - Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil.
- Instituto Nacional de Geografia e Estatística (IBGE), 2003. Pesquisa de orçamentos familiares 2002-2003 - Antropometria e análise do estado nutricional de crianças e adolescentes no Brasil.
- Ioannides-Demos, L.L., Proietto, J., Tonkin, A.M., McNeil, J.J., 2006. Safety of drug therapies used for weight loss and treatment of obesity. *Drug Saf.* 29, 277–302. doi:10.2165/00002018-200629040-00001
- Iriti, M., Faoro, F., 2009. Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3371–3399. doi:10.3390/ijms10083371
- Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Nageshwar Reddy, D., 2015. Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* 21, 8787–8803. doi:10.3748/wjg.v21.i29.8787

- Kennedy, A.J., Ellacott, K.L.J., King, V.L., Hasty, A.H., 2010. Mouse models of the metabolic syndrome. *Dis. Model. Mech.* 3, 156–66. doi:10.1242/dmm.003467
- Khan, M.J., Gerasimidis, K., Edwards, C.A., Shaikh, M.G., 2016. Role of Gut Microbiota in the Aetiology of Obesity: Proposed Mechanisms and Review of the Literature. *J. Obes.* 2016. doi:10.1155/2016/7353642
- Kral, T.V.E., Rolls, B.J., 2011. *Portion Size and the Obesity Epidemic*, The Journal of Nutrition. Oxford University Press.
doi:10.1093/oxfordhb/9780199736362.013.0022
- Kuo, S., 2013. The Interplay Between Fiber and the Intestinal Microbiome in the Inflammatory Response 1, 2. *Av. Nutr.* 16–28. doi:10.3945/an.112.003046.16
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J.-M., Kennedy, S., Leonard, P., Li, J., Burgdorf, K., Grarup, N., Jørgensen, T., Brandslund, I., Nielsen, H.B., Juncker, A.S., Bertalan, M., Levenez, F., Pons, N., Rasmussen, S., Sunagawa, S., Tap, J., Tims, S., Zoetendal, E.G., Brunak, S., Clément, K., Doré, J., Kleerebezem, M., Kristiansen, K., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., de Vos, W.M., Zucker, J.-D., Raes, J., Hansen, T., Bork, P., Wang, J., Ehrlich, S.D., Pedersen, O., Guedon, E., Delorme, C., Layec, S., Khaci, G., van de Guchte, M., Vandemeulebrouck, G., Jamet, A., Dervyn, R., Sanchez, N., Maguin, E., Haimet, F., Winogradski, Y., Cultrone, A., Leclerc, M., Juste, C., Blottière, H., Pelletier, E., LePaslier, D., Artiguenave, F., Bruls, T., Weissenbach, J., Turner, K., Parkhill, J., Antolin, M., Manichanh, C., Casellas, F., Boruel, N., Varela, E., Torrejon, A., Guarner, F., Denariáz, G., Derrien, M., van Hylckama Vlieg, J.E.T., Veiga, P., Oozeer, R., Knol, J., Rescigno, M., Brechot, C., M'Rini, C., Mérieux, A., Yamada, T., 2013. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500, 541–546. doi:10.1038/nature12506
- Lecomte, V., Kaakoush, N.O., Maloney, C.A., Raipuria, M., Huinao, K.D., Mitchell, H.M., Morris, M.J., 2015. Changes in gut microbiota in rats fed a high fat diet correlate with obesity-associated metabolic parameters. *PLoS One* 10, e0126931. doi:10.1371/journal.pone.0126931
- Lee, H., Lee, I.S., Choue, R., 2013. Obesity, Inflammation and Diet. *Pediatr.*

- Gastroenterol. Hepatol. Nutr. 16, 143–152. doi:10.5223/pghn.2013.16.3.143
- Livingstone, M.B.E., Pourshahidi, L.K., 2014. Portion Size and Obesity. *Adv. Nutr. An Int. Rev. J.* 5, 829–834. doi:10.3945/an.114.007104
- Maffetone, P.B., Laursen, P.B., 2017. The prevalence of overfat adults and children in the US. *Front. Public Heal.* 5, 1–9. doi:10.3389/fpubh.2017.00290
- Maffetone, P.B., Rivera-Dominguez, I., Laursen, P.B., 2017. Overfat adults and children in developed countries: The public health importance of identifying excess body fat. *Front. Public Heal.* 5, 1–11. doi:10.3389/fpubh.2017.00190
- Mamikutty, N., Thent, Z.C., Sapri, S.R., Sahrudin, N.N., Mohd Yusof, M.R., Haji Suhaimi, F., 2014. The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male wistar rats. *Biomed Res. Int.* 2014, 263897. doi:10.1155/2014/263897
- Marchesi, J.R., Adams, D.H., Fava, F., Hermes, G.D.A., Hirschfield, G.M., Hold, G., Quraishi, M.N., Kinross, J., Smidt, H., Tuohy, K.M., Thomas, L. V, Zoetendal, E.G., Hart, A., 2016. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut* 65, 330–339. doi:10.1136/gutjnl-2015-309990
- Martel, J., Ojcius, D.M., Chang, C.-J., Lin, C.-S., Lu, C.-C., Ko, Y.-F., Tseng, S.-F., Lai, H.-C., Young, J.D., 2016. Anti-obesogenic and antidiabetic effects of plants and mushrooms. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13, 149–160. doi:10.1038/nrendo.2016.142
- Monteiro, R., Azevedo, I., 2010. Chronic Inflammation in Obesity and the Metabolic Syndrome. *Mediators Inflamm.* 2010, 1–10. doi:10.1155/2010/289645
- Moore, B.J., 1987. The cafeteria diet-an inappropriate tool for studies of thermogenesis. *J. Nutr.* 117, 227–231.
- Mosca, A., Leclerc, M., Hugot, J.P., 2016. Gut Microbiota Diversity and Human Diseases: Should We Reintroduce Key Predators in Our Ecosystem? *Front. Microbiol.* 7, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2016.00455
- Moura, A.M.M. de, Rozados, H.B.F., Caregnato, S.E., 2005. *Relações Entre Ciência E Tecnologia : Uma Abordagem Preliminar No Âmbito Da Ufrgs.*
- Myles, I.A., 2014. Fast food fever: reviewing the impacts of the Western diet on

immunity. *Nutr. J.* 13, 61. doi:10.1186/1475-2891-13-61

- Naderali, E.K., Ratcliffe, S.H., Dale, M.C., 2009. Obesity and Alzheimer's disease: a link between body weight and cognitive function in old age. *Am. J. Alzheimers. Dis. Other Demen.* 24, 445–9. doi:10.1177/1533317509348208
- National Center for Health Statistics (NCHS), 2016. Health, United States, 2015: with special feature on racial and ethnic health disparities, Health, United States, 2015: with special feature on racial and ethnic health disparities. Hyattsville, MD.
- Nilsson, C., Raun, K., Yan, F., Larsen, M.O., Tang-Christensen, M., 2012. Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta Pharmacol. Sin.* 33, 173–181. doi:10.1038/aps.2011.203
- Opala, T., Rzymiski, P., Pischel, I., Wilczak, M., Wozniak, J., 2006. Efficacy of 12 weeks supplementation of a botanical extract-based weight loss formula on body weight, body composition and blood chemistry in healthy, overweight subjects - A randomised double-blind placebo-controlled clinical trial. *Eur. J. Med. Res.* 11, 343–350.
- Pellizzon, M.A., Ricci, M.R., 2018. The common use of improper control diets in diet-induced metabolic disease research confounds data interpretation : The fiber factor. *Nutr. Metab. (Lond)*. In Press.
- Pittler, M.H., Schmidt, K., Ernst, E., 2005. Adverse events of herbal food supplements for body weight reduction: systematic review. *Obes. Rev.* 6, 93–111. doi:10.1111/j.1467-789X.2005.00169.x
- Rabot, S., Membrez, M., Blancher, F., Berger, B., Moine, D., Krause, L., Bibiloni, R., Bruneau, A., Gérard, P., Siddharth, J., Lauber, C.L., Chou, C.J., Ley, R.E., Smith, M.I., Blanton, L. V., Wu, G.D., David, L.A., Ferrer, M., Turnbaugh, P.J., Arumugam, M., Patil, D.P., Yatsunenkov, T., Goodrich, J.K., Kovacs, A., Vijay-Kumar, M., Burcelin, R., Crivelli, V., Dacosta, A., Roy-Tirelli, A., Thorens, B., Rossmeisl, M., Rim, J.S., Koza, R.A., Kozak, L.P., Fan, C., Chou, C.J., Membrez, M., Blancher, F., Backhed, F., Manchester, J.K., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I., Rabot, S., Turnbaugh, P.J., Backhed, F., Fulton, L., Gordon, J.I., Turnbaugh, P.J., Turnbaugh, P.J., Ridaura, V.K., Wang, Z.Q., Wit, N. de, Montgomery, M.K., Rajilic-Stojanovic, M., Vos, W.M. de, Matthies, C., Evers, S., Ludwig, W., Schink,

- B., Gao, Z., Henagan, T.M., Everard, A., Ma, W., Stenman, L.K., Amar, J., Le, T.K., Cani, P.D., Cani, P.D., Garidou, L., Suarez-Zamorano, N., Cani, P.D., Chimerel, C., Kasubuchi, M., Hasegawa, S., Hiramatsu, T., Ichimura, A., Kimura, I., Everard, A., Hamady, M., Walker, J.J., Harris, J.K., Gold, N.J., Knight, R., Claus, S.P., Huse, S.M., Huber, J.A., Morrison, H.G., Sogin, M.L., Welch, D.M., Caporaso, J.G., Schloss, P.D., Segata, N., 2016. High fat diet drives obesity regardless the composition of gut microbiota in mice. *Sci. Rep.* 6, 32484. doi:10.1038/srep32484
- Ravussin, E., Galgani, J.E., 2011. The Implication of Brown Adipose Tissue for Humans. *Annu. Rev. Nutr.* 31, 33–47. doi:10.1146/annurev-nutr-072610-145209
- Reardon, S., 2016. A mouse’s house may ruin experiments. *Nature* 530, 264–264. doi:10.1038/nature.2016.19335
- Restani, P., Di Lorenzo, C., Garcia-Alvarez, A., Badea, M., Ceschi, A., Egan, B., Dima, L., Lüde, S., Maggi, F.M., Marculescu, A., Milà-Villarrol, R., Raats, M.M., Ribas-Barba, L., Uusitalo, L., Serra-Majem, L., 2016. Adverse effects of plant food supplements self-reported by consumers in the PlantLIBRA survey involving six european countries. *PLoS One* 11, 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0150089
- Rosenbaum, M., Knight, R., Leibel, R.L., 2015. The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity. *Trends Endocrinol. Metab.* 26, 493–501. doi:10.1016/j.tem.2015.07.002
- Sampey, B.P., Vanhoose, A.M., Winfield, H.M., Freerman, A.J., Muehlbauer, M.J., Fueger, P.T., Newgard, C.B., Makowski, L., 2011. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity* 19, 1109–1117. doi:10.1038/oby.2011.18
- Scarpellini, E., Ianiro, G., Attili, F., Bassanelli, C., De Santis, A., Gasbarrini, A., 2015. The human gut microbiota and virome: Potential therapeutic implications. *Dig. Liver Dis.* 47, 1007–1012. doi:10.1016/j.dld.2015.07.008
- Schimpl, F.C., da Silva, J.F., Gonçalves, J.F.D.C., Mazzafera, P., 2013. Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. *J. Ethnopharmacol.* 150, 14–31. doi:10.1016/j.jep.2013.08.023
- Sender, R., Fuchs, S., Milo, R., 2016. Revised Estimates for the Number of Human and

- Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 14, 1–14.
doi:10.1371/journal.pbio.1002533
- Servick, K., 2016. Mouse microbes may make scientific studies harder to replicate. *Science* (80-.). doi:10.1126/science.aah7199
- Shekelle, P.G., Hardy, M.L., Morton, S.C., Maglione, M., Mojica, W.A., Sutton, M.J., Rhodes, S.L., Jungvig, L., Gagné, J., 2003. Efficacy and Safety of Ephedra and Ephedrine for Weight Loss and Athletic Performance. *JAMA* 289, 1537.
doi:10.1001/jama.289.12.1470
- Shen, J., Obin, M.S., Zhao, L., 2013. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol. Aspects Med.* 34, 39–58. doi:10.1016/j.mam.2012.11.001
- Slavin, J.L., 2005. Dietary fiber and body weight. *Nutrition* 21, 411–418.
doi:10.1016/j.nut.2004.08.018
- Soares, M.B., Ramalho, J.B., Izaguirry, A.P., Pavin, N.F., Spiazzi, C.C., Schimdt, H.L., Mello-Carpes, P.B., Santos, F.W., 2017. Comparative effect of *Camellia sinensis* teas on object recognition test deficit and metabolic changes induced by cafeteria diet. *Nutr. Neurosci.* 30, 1–10. doi:10.1080/1028415X.2017.1418726
- Sonnenburg, J.L., Bäckhed, F., 2016. Diet–microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature* 535, 56–64. doi:10.1038/nature18846
- Stein, C.J., Colditz, G.A., 2004. The Epidemic of Obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2522–2525. doi:10.1210/jc.2004-0288
- Temple, J.L., Bernard, C., Lipshultz, S.E., Czachor, J.D., Westphal, J.A., Mestre, M.A., 2017. The Safety of Ingested Caffeine: A Comprehensive Review. *Front. Psychiatry* 8, 1–19. doi:10.3389/fpsy.2017.00080
- Thursby, E., Juge, N., 2017. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.* 474, 1823–1836. doi:10.1042/BCJ20160510
- Tremaroli, V., Bäckhed, F., 2012. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489, 242–249. doi:10.1038/nature11552
- Turnbaugh, P.J., Bäckhed, F., Fulton, L., Gordon, J.I., 2008. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome.

- Cell Host Microbe 3, 213–223. doi:10.1016/j.chom.2008.02.015
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M. a, Magrini, V., Mardis, E.R., Gordon, J.I., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027–31. doi:10.1038/nature05414
- USDA, (United States Department of Agriculture), 2012. Nutrient intakes from food: mean amounts of consumed per individual, by gender and age [WWW Document]. What we eat Am. Natl. Heal. Nutr. Exam. Surv. 2011-2012. URL www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/fsrg. (accessed 1.1.15).
- Valk, E.S. van der, Savas, M., Burgerhart, J.S., Vries, M. de, Akker, E.L.T. van den, Rossum, E.F. van, 2017. Obesity in the clinic room: diagnostics first, followed by effective treatment. *Ned. Tijdschr. Geneeskd.* 161, D2310.
- Walker, A.W., Parkhill, J., 2013. Fighting obesity with bacteria. *Science* (80-.). 341, 1069–1070. doi:10.1126/science.1243787
- Warden, C.H., Fisler, J.S., 2008. Comparisons of Diets Used in Animal Models of High-Fat Feeding. *Cell Metab.* 7, 277. doi:10.1016/j.cmet.2008.03.014
- Wu, G.D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.-Y., Keilbaugh, S.A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W.A., Knight, R., Sinha, R., Gilroy, E., Gupta, K., Baldassano, R., Nessel, L., Li, H., Bushman, F.D., Lewis, J.D., 2011. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* (80-.). 334, 105–108. doi:10.1126/science.1208344
- Young, L.R., Nestle, M., 2002. The Contribution of Expanding Portion Sizes to the US Obesity Epidemic. *Am. J. Public Health* 92, 246–249. doi:10.2105/AJPH.92.2.246
- Zhernakova, A., Kurilshikov, A., Bonder, M.J., Tigchelaar, E.F., Schirmer, M., Vatanen, T., Mujagic, Z., Vila, A.V., Falony, G., Vieira-Silva, S., Wang, J., Imhann, F., Brandsma, E., Jankipersadsing, S.A., Joossens, M., Cenit, M.C., Deelen, P., Swertz, M.A., Weersma, R.K., Feskens, E.J.M., Netea, M.G., Gevers, D., Jonkers, D., Franke, L., Aulchenko, Y.S., Huttenhower, C., Raes, J., Hofker, M.H., Xavier, R.J., Wijmenga, C., Fu, J., 2016. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science* (80-.). 352, 565–569. doi:10.1126/science.aad3369

8. ANEXOS

8.1 Cópia da carta de aprovação da comissão de ética no uso de animais (CEUA) para o desenvolvimento dos experimentos *in vivo*.



U F R G S

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 27648

Título: Dieta de cafeteria padronizada como um modelo mais robusto e reprodutível para estudar a síndrome metabólica e a obesidade associada à dieta ocidental: papel de extratos hepatoprotetores e termogênico

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

JOSE CLAUDIO FONSECA MOREIRA - coordenador desde 01/09/2014
DANIEL PENS GELAIN - pesquisador desde 01/09/2014
Carlos Eduardo Schnorr - Aluno de Doutorado desde 01/09/2014
Rafael Calixto Bortolin - Aluno de Doutorado desde 01/09/2014
Juciano Gasparotto - Aluno de Doutorado desde 01/09/2014

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 15/09/2014 - Sala I do Gabinete do Reitor - Prédio da Reitoria - Campus do Centro - Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 132 ratos machos Wistar de 60 dias, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 25 de Setembro de 2014

CRISTIANE MATTE
Vice Coordenador da comissão de ética

8.2 Outros artigos publicados durante o período do doutorado como autor ou coautor

1. Moresco KS, Silveira AK, Schnorr CE, Zeidán-Chuliá F, **Bortolin RC**, et al. Supplementation with *Achyrocline satureioides* Inflorescence Extracts to Pregnant and Breastfeeding Rats Induces Tissue-Specific Changes in Enzymatic Activity and Lower Neonatal Survival. *Biomedicines*. 29; 5(3). pii: E53, 2017.

URL: <http://www.mdpi.com/2227-9059/5/3/53>

DOI: 10.3390/biomedicines5030053

2. Gasparotto J, Ribeiro CT, **Bortolin RC**, et al. Anti-RAGE antibody selectively blocks acute systemic inflammatory responses to LPS in serum, liver, CSF and striatum. *Brain Behav Immun*. v.62, p.124 - 136, 2017.

URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28088642>

DOI: 10.1016/j.bbi.2017.01.008

3. De Bona GS, Boschetti W, **Bortolin RC**, et al. Characterization of dietary constituents and antioxidant capacity of *Tropaeolum pentaphyllum* Lam.. *J Food Sci Technol*. 2017. [Epub ahead of print]

URL: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13197-017-2817-z>

DOI: 10.1007/s13197-017-2817-z

4. Gasparotto J, Kunzler A, Senger MR, Souza CD, Simone SG, **Bortolin RC**, et al. N-acetyl-cysteine inhibits liver oxidative stress markers in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v.112, p.146 - 154, 2017.

URL: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762017000200146&lng=en&tlng=en

DOI: 10.1590/0074-02760160403

5. Petiz LL, Kunzler A, **Bortolin RC**, et al. Role of vitamin A oral supplementation on oxidative stress and inflammatory response in the liver of trained rats. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2017. [Epub ahead of print]

URL: <http://www.mdpi.com/2072-6643/9/4/353>

DOI: 10.3390/nu9040353

6. Menegat MB, Mellagi AP, **Bortolin RC**, et al.

Sperm quality and oxidative status as affected by homogenization of liquid-stored boar semen diluted in short- and long-term extenders. *Anim Reprod Sci.*, v.179, p.67 - 79, 2017.

URL:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432016303335?via%3Dihub>

DOI: 10.1016/j.anireprosci.2017.02.003

7. Gasparotto J, Ribeiro CT, **Bortolin RC**, et al.

Targeted inhibition of RAGE in substantia nigra of rats blocks 6-OHDA-induced dopaminergic denervation. *Sci Rep.* 2017. [Epub ahead of print]

URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-09257-3>

DOI: 10.1038/s41598-017-09257-3

8. Petiz LL, Girardi CS, **Bortolin RC**, et al.

Vitamin A Oral Supplementation Induces Oxidative Stress and Suppresses IL-10 and HSP70 in Skeletal Muscle of Trained Rats. *Nutrients.* , v.9, p.353 - , 2017.

URL: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/apnm-2017-0193#.WbGWLKGNQ>

DOI: 10.1139/apnm-2017-0193

9. Bittencourt LS, **Bortolin RC**, et al.

Antioxidant Profile Characterization of a Commercial *Paullinia cupana* (Guarana) Extracts. *Journal of Natural Products and Resources.* , v.2, p.47 - 52, 2016.

URL: <http://jacsdirectory.com/journal-of-natural-products-and-resources/articleview.php?id=13>

10. Assumpção CF, Nunes IL, **Bortolin RC**, et al.

Bioactive Compounds and Stability of Organic and Conventional *Vitis labrusca* Grape Seed Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* , v.93, p.115 - 124, 2016.

URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11746-015-2742-0>

DOI: 10.1007/s1174

11. Kunzler A, Zeidán-Chuliá F, Gasparotto J, Girardi CS, Klafke K, Petiz LL, **Bortolin RC**, et al.

Changes in Cell Cycle and Up-Regulation of Neuronal Markers During SH-SY5Y Neurodifferentiation by Retinoic Acid are Mediated by Reactive Species Production and Oxidative Stress. *Mol Neurobiol*. 2016. [Epub ahead of print]

URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-016-0189-4>

DOI: 10.1007/s12035-016-0189-4

12. **Bortolin RC**, et al.

Chronic ozone exposure alters the secondary metabolite profile, antioxidant potential, anti-inflammatory property, and quality of red pepper fruit from *Capsicum baccatum*. *Ecotoxicol Environ Saf.* , v.129, p.16 - 24, 2016.

URL:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651316300641?via%3Dihub>

DOI: 10.1016/j.ecoenv.2016.03.004

13. Morrone Mda S, Schnorr CE, Behr GA, Gasparotto J, **Bortolin RC**, et al.

Curcumin Supplementation Decreases Intestinal Adiposity Accumulation, Serum Cholesterol Alterations, and Oxidative Stress in Ovariectomized Rats. *Oxid Med Cell Longev.*, v.2016, p.1 - 12, 2016. [Epub ahead of print]

URL: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/5719291/>

DOI: 10.1155/2016/5719291

14. **Bortolin RC**, et al.

Effects of Freeze-Thaw and Storage on Enzymatic Activities, Protein Oxidative Damage, and Immunocontent of the Blood, Liver, and Brain of Rats. *Biopreserv Biobank.* , v.15, p.182 - 190, 2016.

URL: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/bio.2016.0023>

DOI: 10.1089/bio.2016.0023

15. Da Silva Morrone M, Schnorr CE, Behr GA, Gasparotto J, **Bortolin RC**, et al.

Oral administration of curcumin relieves behavioral alterations and oxidative stress in the frontal cortex, hippocampus, and striatum of ovariectomized Wistar rats. *J Nutr Biochem.* , v.32, p.181 - 188, 2016.

URL:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286316300304?via%3Dihub>

DOI: 10.1016/j.jnutbio.2016.03.010

16. Balestrin LA, Bidone J, **Bortolin RC**, et al.

Protective effect of a hydrogel containing Achyrocline satureioides extract-loaded nanoemulsion against UV-induced skin damage. *J Photochem Photobiol B.* , v.163, p.269 - 276, 2016.

URL:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134415301883?via%3Dihub>

DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.08.039

17. Fagundes AC, Stahl HV, **Bortolin RC**, et al.

Carotenoid Content and Antioxidant Activity of Organic and Conventional Grape Juice Processing Waste. *Current Bioactive Compounds.* , v.11, p.249 - 255, 2015.

URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11746-015-2742-0>

DOI: 10.1007/s11746-015-2742-0

18. Gasparotto J, Senger MR, Kunzler A, Degrossoli A, de Simone SG, **Bortolin RC**, et al.

Increased tau phosphorylation and receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in the brain of mice infected with *Leishmania amazonensis*. *Brain Behav Immun.* v.43, p.37 - 45, 2015.

URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25014011>

DOI: 10.1016/j.bbi.2014.06.204

19. Dória GA, Santos AR, Bittencourt LS, **Bortolin RC**, et al.

Redox-Active Profile Characterization of *Remirea maritima* Extracts and Its Cytotoxic Effect in Mouse Fibroblasts (L929) and Melanoma (B16F10) Cells. *Molecules (Basel, Online).* v.20, p.11699 - 11718, 2015.

URL: <http://www.mdpi.com/1420-3049/20/7/11699>

DOI: 10.3390/molecules200711699

20. Gasparotto J, Petiz LL, Girardi CS, **Bortolin RC**, et al.

Supplementation with vitamin A enhances oxidative stress in the lungs of rats submitted to aerobic exercise. *Appl Physiol Nutr Metab.* , v.40, p.1253 - 1261, 2015.

URL: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/apnm-2015-0218#.WbI6LKGNaQ>

DOI: 10.1139/apnm-2015-0218

21. **Bortolin RC**, et al.

Effects of chronic elevated ozone concentration on the redox state and fruit yield of red pepper plant *Capsicum baccatum*. *Ecotoxicol Environ Saf.* , v.100, p.114 - 121, 2014.

URL:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014765131300420X?via%3Dihub>

DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.09.035

22. Gasparotto J, Somensi N, **Bortolin RC**, et al.

Effects of different products of peach (*Prunus persica* L. Batsch) from a variety developed in southern Brazil on oxidative stress and inflammatory parameters in vitro and ex vivo. *J Clin Biochem Nutr.* , v.55, p.110 - 119, 2014.

URL: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jcbn/55/2/5513-97/article>

DOI: 10.3164/jcbn.13-97

23. Gasparotto J, Somensi N, **Bortolin RC**, et al.

Preventive supplementation with fresh and preserved peach attenuates CCl₄-induced oxidative stress, inflammation and tissue damage. *J Nutr Biochem.* , v.25, p.1282 - 1295, 2014.

URL:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286314001685?via%3Dihub>

DOI: 10.1016/j.jnutbio.2014.07.004