

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

Samia Squizani

**O papel da suplementação de zinco
em ratos obesos: impactos sobre a
microbiota intestinal, perfil de ácidos
graxos e marcadores neurofuncionais**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2022**

Samia Squizani

O papel da suplementação de zinco em ratos obesos: impactos sobre a microbiota intestinal, perfil de ácidos graxos e marcadores neurofuncionais

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Dra. Renata Padilha Guedes

Porto Alegre

2022

Catálogo na Publicação

Squizani, Samia Squizani

O papel da suplementação de zinco em ratos obesos: impactos sobre a microbiota intestinal, perfil de ácidos graxos e marcadores neurofuncionais / Samia Squizani Squizani. -- 2021.

97 f. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2021.

Orientador(a): Prof. Dra. Renata Padilha Guedes Guedes.

1. Obesidade. 2. Dieta de cafeteria. 3. Inflamação. 4. Microbiota intestinal. 5. Zinco . I. Título.

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Fisiologia Comportamental e Metabólica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Recebeu suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - FAPERGS, PPSUS/2017, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Renata Padilha Guedes por ter me dado a oportunidade de trabalhar em seu laboratório, por todos os ensinamentos profissionais, pelo seu apoio e compreensão.

As professoras Júlia Genro e Adriana Seixas, membros da minha comissão de acompanhamento.

Aos meus colegas do laboratório 502, por todo apoio e companheirismo em todas as etapas de meu mestrado.

À minha amiga, Laura Beier por sua imensa dedicação, apoio, carinho, compreensão e por sempre me ajudar.

À minha mãe Rosana Garcia Fiunte Squizani pelo imenso amor e carinho, por se fazer presente mesmo de longe, por ser minha base, por sempre me apoiar e acreditar no meu potencial.

Ao meu pai Benoni Luís Squizani pelo amor incondicional, pelo abraço de urso, por ser meu eterno exemplo de farmacêutico, por não medir esforços para me ajudar e me incentivar a buscar conhecimento.

À minha irmã Eamim Squizani pelo companheirismo e por ser meu exemplo de pesquisadora.

À Amora, por ser minha companheira de todos os dias, pelo carinho, amor e por tornar minha caminhada no mestrado mais leve.

Ao Artur, pelo companheirismo e por ser meu aconchego em Porto Alegre.

Ao criador e aos meus guias, pela vida e por me auxiliarem para tornarem esse sonho possível.

À UFCSPA por me proporcionar essa oportunidade e pelo ensino de qualidade.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Obesidade	13
1.2 Dieta de cafeteria	14
1.3 Inflamação periférica e neuroinflamação	15
1.4 Barreira intestinal e barreira hematoencefálica	20
1.5 Microbiota intestinal	24
1.6 Ácidos graxos	31
1.7 Zinco	35
2 OBJETIVOS	40
2.1 Objetivo geral	40
2.2 Objetivos específicos	40
3 REFERÊNCIAS	41
4 ARTIGO CIENTÍFICO	62
5 CONCLUSÃO	89
ANEXOS	90
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	90
Currículo lattes	94

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC	ácidos graxos de cadeia curta
AgRP	proteína relacionada agouti
AGS	ácidos graxos saturados
AIM2	proteína AIM2 induzível por interferon
AMPK	proteína cinase ativada por AMP
ARC	núcleo arqueado
BCFA	ácidos graxos de cadeia ramificada
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE	barreira hematoencefálica
CAF	dieta de cafeteria
CART	transcrito regulado por anfetamina e cocaína
CCK	colecistocinina
DAMPs	padrões moleculares associados a danos
DCNT	doenças crônicas não transmissíveis
FFAR	receptores de ácidos graxos livres
GABA	ácido γ -aminobutírico
GALT	tecido linfóide associado ao intestino
GLP-1	<i>glucagon-like peptide-1</i>
GPR-109A	receptor acoplado à proteína G-109A
GPR-41	receptor acoplado à proteína G-41
GPR-43	receptor acoplado à proteína G-43
HDAC	histona desacetilase
HFD	dieta rica em gordura
HPA	eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
IL-10	interleucina-10
IL-18	interleucina-18
IL-1 α	interleucina-1alfa
IL-1 β	interleucina-1beta
IL-6	interleucina-6
INF- γ	Interferon-gama

LPS	lipopolissacarídeo
MMP	metaloproteinase de matriz
NF-kB	fator de transcrição nuclear Kappa B
NLRP3	proteína 3 que contém domínio de pirina da família NLR
NLRP6	proteína 6 que contém domínio de pirina da família NLR
NPY	neuropeptídeo Y
NTS	núcleo do trato solitário
OMS	organização mundial da saúde
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
POMC	pró-opiomelanocortina
PPAR- γ	receptor γ ativado pelo proliferador de peroxissoma
PRR	receptor de reconhecimento de padrão
PYY	peptídeo YY
SNA	sistema nervoso autônomo
SNC	sistema nervoso central
SNE	sistema nervoso entérico
TGI	trato gastrointestinal
TiO ₂	dióxido de titânio
TLR-4	receptor do tipo toll 4
TLRs	receptor do tipo toll
TNF- α	fator de necrose tumoral-alfa
Treg	células T reguladoras
VIGITEL	vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico
Zn	zinco
ZO-1	zônula occludens-1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Interação entre a microbiota e o eixo intestino-cérebro na obesidade.

Figura 2 Estrutura das barreiras intestinal e hematoencefálica.

Figura 3 Esquema da composição taxonômica da microbiota intestinal.

RESUMO

A obesidade é um dos principais problemas de saúde pública mundial. É caracterizada por um estado inflamatório crônico e, mais recentemente, tem sido relacionada com alterações da microbiota intestinal que, por sua vez, podem intensificar a resposta pró-inflamatória. Esse quadro afeta múltiplos órgãos e tecidos do organismo, incluindo o sistema nervoso central (SNC). O zinco (Zn) é um micronutriente amplamente distribuído em todo o corpo humano, e desempenha um papel importante na regulação da inflamação. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação de Zn sobre a microbiota intestinal, perfil de ácidos graxos, integridade das barreiras intestinal e hematoencefálica (BHE) e marcadores de plasticidade sináptica em ratos machos *Wistar* obesos. Para isso, foi oferecido uma dieta padrão (CT) e a dieta de cafeteria (CAF) durante 20 semanas. O modelo animal de CAF consiste na oferta de alimentos industrializados, altamente palatáveis e com alta densidade energética. A partir da 16ª semana, os animais iniciaram a suplementação de Zn por gavagem (10 mg/kg/dia) até o final da 20ª semana do estudo. Após a eutanásia, foram coletadas as amostras de fezes e tecidos intestinal e encefálico. A partir das amostras de fezes foi realizado o sequenciamento da microbiota intestinal 16S rRNA. As amostras de tecido intestinal foram utilizadas para avaliar a morfologia, a expressão proteica dos constituintes da barreira intestinal e para as dosagens dos ácidos graxos. O tecido encefálico foi dissecado em córtex cerebral e hipocampo que, posteriormente, foram utilizados para avaliar a integridade da barreira hematoencefálica (BHE) e marcadores sinápticos. Nossos resultados demonstram que o consumo crônico de CAF causa disbiose da microbiota intestinal, alteração morfológica e diminuição dos níveis de ácido graxo de cadeia curta (AGCC) no cólon, juntamente com aumento de ácidos graxos saturados. A BHE também pode estar comprometida em animais alimentados com CAF, uma vez que a expressão de claudina-5 é reduzida no córtex cerebral. Além disso, a sinaptofisina diminuiu no hipocampo, o que pode afetar a função sináptica. Dessa forma, o consumo de alimentos ultraprocessados, conforme previsto pela CAF, é um modelo robusto para indução de obesidade e complicações de saúde. Nesta condição, a suplementação de Zn não foi capaz de

proteger os animais obesos que receberam CAF da disbiose intestinal. No entanto, foi observado um aumento nos níveis de acetato, o que sugere um efeito benéfico parcial do Zn. Ademais, não foi observado um papel neuroprotetor do Zn no SNC. Com base nesses resultados, embora seja amplamente demonstrado na literatura que suplementação de Zn apresenta efeitos benéficos sobre a saúde, a sua suplementação pode não ser suficiente para proteger das disfunções relacionadas à obesidade.

Palavras-Chave: obesidade, dieta de cafeteria (CAF), inflamação, microbiota intestinal, ácido graxo de cadeia curta (AGCC) e zinco (Zn).

ABSTRACT

Obesity is one of the main public health problems worldwide. It is characterized by a chronic inflammatory state and, more recently, it has been related to changes in the intestinal microbiota, which, in turn, can intensify the pro-inflammatory response. This condition affects multiple organs and tissues of the body, including the central nervous system (CNS). Zinc (Zn) is a micronutrient that is widely distributed throughout the human body, and it plays an important role in regulating inflammation. Thus, the present study aimed to evaluate the effect of Zn supplementation on the intestinal microbiota, fatty acids profile, intestinal and blood-brain barriers and synaptic plasticity markers in obese male Wistar rats. For this, a standard diet (CT) and cafeteria diet (CAF) were offered for 20 weeks. The CAF model offers highly palatable industrialized foods with high energy density. From the 16th week, the animals started Zn supplementation by gavage (10 mg/kg/day) until the end of the study. After euthanasia, samples of feces, intestinal, and brain tissue were collected. From the stool samples, the intestinal microbiota 16S rRNA sequencing was performed. The intestinal tissue samples were used to evaluate the morphology, the protein expression of the intestinal barrier constituents, and for the determination of fatty acids. Brain tissue was dissected into the cerebral cortex and hippocampus which were later used to assess the integrity of the blood-brain barrier (BBB) and synaptic markers. Our results demonstrate that chronic consumption of CAF causes dysbiosis of the intestinal microbiota, morphological alteration, and decreased levels of short-chain fatty acid (SCFA) in the colon, along with an increase in saturated fatty acids. BBB may also be compromised in CAF-fed animals, as the claudin-5 expression is reduced in the cerebral cortex. In addition, synaptophysin was decreased in the hippocampus, which may affect synaptic function. Thus, the consumption of ultra-processed foods, as predicted by CAF, is a robust model for inducing obesity and health complications. In this condition, zinc supplementation was not able to protect obese animals that received CAF from intestinal dysbiosis. However, an increase in acetate levels was observed, which suggests a partial beneficial effect of Zn. Furthermore, a neuroprotective role of Zn in the CNS was not observed. Based on these results, although it is widely demonstrated in the literature

that Zn supplementation has beneficial effects on health, its supplementation may not be sufficient to protect from obesity-related dysfunctions.

Keywords: obesity, cafeteria diet (CAF), inflammation, gut microbiota, short-chain fatty acid (SCFA) and zinc (Zn).

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

A obesidade é um grave problema de saúde pública e vem aumentando substancialmente nos últimos 50 anos, sendo considerada uma pandemia mundial (1). Segundo dados do último levantamento da Organização Mundial de Saúde (OMS), realizado no ano de 2016, a prevalência de adultos obesos era superior a 670 milhões de indivíduos no mundo (2). A Federação Mundial de Obesidade estima que em 2030 a prevalência global de indivíduos adultos com obesidade será de 18 % (3). No Brasil, de acordo com o último levantamento da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), realizado no ano de 2021, 57,2 % dos indivíduos adultos foram classificados com sobrepeso e 22,4 % com obesidade (4).

A obesidade é uma doença crônica e multifatorial que pode ser desencadeada por uma variedade de fatores, tais como alimentação inadequada, redução da prática de atividade física, qualidade do sono, desregulação endócrina, utilização de medicamentos, tabagismo, fatores epigenéticos, urbanização e fatores socioeconômicos (1,5). A fisiopatologia da doença é caracterizada por um acúmulo anormal e/ou excessivo de gordura, definido por um índice de massa corporal (IMC) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ (6). Como consequência, é observada uma disfunção no metabolismo dos carboidratos e na secreção e ação de hormônios reguladores, como insulina e leptina, que atuam no controle dos níveis de adiposidade e da fome, respectivamente (7–9). Sendo assim, a alta prevalência da obesidade é acompanhada de risco aumentado para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (10,11). Além disso, dentro do quadro da pandemia da COVID-19, está bem estabelecido que a obesidade é um dos fatores de risco para a ocorrência de quadros mais severos da doença (12). Dessa forma, o combate à obesidade deve ser prioridade para minimizar o impacto ou o desenvolvimento de outras doenças.

1.2 Dieta de cafeteria

Nesse contexto, observou-se uma transição na produção global de alimentos e uma mudança significativa nos padrões alimentares nos últimos anos. A dieta de padrão ocidental é composta, em grande parte, por alimentos ultraprocessados, ricos em gordura saturada, sal, açúcar, e com uma alta densidade energética (13). Esse padrão alimentar que está associado ao aumento da prevalência da obesidade, estabelece uma inflamação crônica de baixo grau, e contribui para o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo II, doenças cardiovasculares, síndrome metabólica, câncer, e até mesmo a desordens emocionais e comprometimento cognitivo (14–17). Mais recentemente, foi associado a alterações na microbiota intestinal que, por sua vez, podem intensificar o estado inflamatório crônico que é observado na obesidade (17–19). De fato, já foi demonstrado que a composição da dieta, incluindo a distribuição de macronutrientes e micronutrientes, e até mesmo a presença de aditivos alimentares podem alterar a homeostase da microbiota intestinal (20–22).

A dieta de cafeteria (CAF) é muito utilizada em modelos experimentais para indução de obesidade. Este modelo consiste na oferta ilimitada de alimentos ultraprocessados a fim de mimetizar o padrão alimentar dos humanos (23). Estudos mostram que, diferentemente de outros modelos obesogênicos, como a dieta rica em gordura (*high fat diet*, HFD), a CAF contribui para a hiperfagia e obesidade devido às suas propriedades hedônicas e capacidade de estimular o sistema de recompensa (24–26).

Já está bem estabelecido que a CAF é um modelo robusto de obesidade induzida por dieta. Este modelo induz distúrbios relacionados à obesidade, como disbiose, distúrbios metabólicos, inflamação sistêmica de baixo grau, neuroinflamação e disfunções comportamentais em roedores (20,27–29). Além disso, a CAF expõe os animais aos alimentos ultraprocessados que contêm alto teor de açúcar e sal, alto teor de gordura e grande quantidade de aditivos alimentares, tais como corantes, emulsificantes, adoçantes e conservantes (20,21). Em um estudo prévio já publicado que utilizou os mesmos animais do presente estudo foi

demonstrado que o consumo crônico da CAF por 20 semanas induziu um aumento no peso corporal, na adiposidade visceral, e na concentração plasmática de fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Além disso, foi capaz de induzir alterações metabólicas, como elevação dos triglicerídeos e glicose em jejum e também, causar um aumento de marcadores neuroinflamatórios (30).

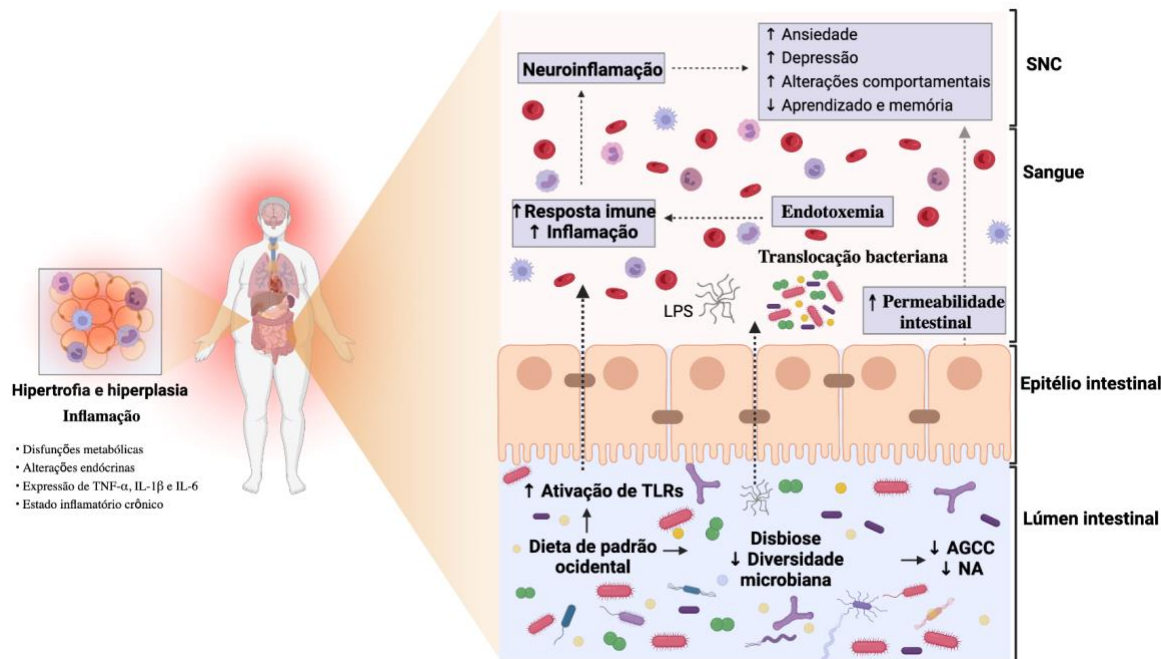
1.3 Inflamação periférica e neuroinflamação

A inflamação aguda é uma resposta fisiológica do sistema imune na tentativa de defesa e reestabelecimento das funções fisiológicas e homeostase. Caso essa resposta inflamatória perdure, será estabelecida uma inflamação crônica de baixo grau, considerada prejudicial ao nosso organismo. Este tipo de inflamação é comumente observada na obesidade e afeta tecidos metabólicos, por isso, também é conhecida como meta-inflamação (31–33). Assim, a hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo observadas na obesidade é acompanhada pela expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e infiltração de células imunes no tecido adiposo (34,35). Esse quadro de sinalização pró-inflamatória é seguido pela ativação de receptores do tipo toll (*toll like receptor*, TLR) e, conseqüentemente, pela indução de várias alterações intracelulares que resultam em desequilíbrios metabólicos (33). Os TLRs são receptores de membrana que possuem um papel muito importante na sinalização e identificação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs). O TLR-4, membro da família TLR, é um receptor de reconhecimento de padrão (PRR), sendo capaz de reconhecer o lipídio A, componente do lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular de bactérias gram-negativas (36–38). A alteração da microbiota intestinal provocada pela dieta de padrão ocidental pode levar a um aumento dos níveis sanguíneos de LPS que, por sua vez, pode ativar o TLR-4 (19,38,39). Com isso, ocorre a sinalização da cascata de ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), que estimula a transcrição gênica de citocinas pró-inflamatórias (40).

Dessa forma, os ácidos graxos saturados (AGS) atuam como agonistas não microbianos do TLR-4, compartilhando um mecanismo de ação comum com o LPS

(41–43). Foi sugerido que o potencial mecanismo pelo qual os AGS estimulam o TLR4 é devido à semelhança estrutural com o lipídio A, componente do LPS (44,45). Além disso, foi demonstrado que os AGS estimulam a via NF- κ B por meio do TLR-4, levando a um aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e o TNF- α (45–47). Sendo assim, o consumo exacerbado de AGS causa diversas consequências sobre a microbiota intestinal, incluindo disbiose e disfunção da barreira intestinal. Consequentemente, ocorre extravasamento de bactérias e outras substâncias para a corrente sanguínea. Essas alterações podem potencializar o estado pró-inflamatório conforme ilustrado na Figura 1 (18,45).

Figura 1. Interação entre a microbiota e o eixo intestino-cérebro na obesidade. O consumo crônico de uma dieta de padrão ocidental contribui para o desenvolvimento de obesidade e alteração da microbiota intestinal (disbiose). Nesse contexto, há uma diminuição da diversidade microbiana, associada a uma redução na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e neurotransmissores (NA). Ainda, há uma maior ativação de TLR-4 seguida de inflamação, maior permeabilidade da barreira epitelial intestinal que facilita a translocação bacteriana, e promove endotoxemia. Com isso, essa inflamação sistêmica pode chegar no SNC e induzir uma neuroinflamação, e alterações cognitivas e comportamentais (figura adaptada de Agustí *et al.*, 2018).



Além disso, a obesidade também tem sido relacionada a alterações da microbiota intestinal que, por sua vez, podem intensificar a resposta pró-inflamatória. Este quadro afeta múltiplos órgãos e tecidos do organismo, incluindo o sistema nervoso central (SNC) (15,17,48). Na neuroinflamação há a ativação do sistema imunológico inato como a primeira linha de defesa do SNC, para opsonizar e fagocitar as células apoptóticas. Ainda, ocorre um recrutamento de células do sistema imune adaptativo para a secreção de quimiocinas e citocinas (49,50). Nesse contexto, há um envolvimento importante das células gliais, como microglia, astrócitos e oligodendrócitos que podem ser estimuladas por elementos advindos da periferia (51,52). Assim, estas células passam a apresentar um fenótipo pró-inflamatório. No fenótipo A1 (clássico, pró-inflamatório), os astrócitos secretam citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 alfa (IL-1 α), TNF- α e complemento c1q (53,54). Já no fenótipo M1 (clássico, pró-inflamatório), as células microgliais secretam IL-6, interferon-gama (IFN- γ) e TNF- α (52,55). Os TLRs são amplamente expressos pelas células gliais e neurônios e, quando ativados, desencadeiam a síntese de citocinas pró-inflamatórias (49,50).

A neuroinflamação pode acometer múltiplas regiões encefálicas devido à alta propagação do processo neuroinflamatório e pelo envolvimento e interação de diferentes mecanismos. Dentre as regiões afetadas pela neuroinflamação, destacam-se o córtex cerebral, hipotálamo e hipocampo (56). O córtex cerebral é uma estrutura cerebral conhecida por mediar processos complexos como comportamento, cognição, planejamento e controle de impulsos. O córtex pré-frontal está anatomicamente conectado à maioria das partes do cérebro cortical e subcortical. Assim, participa de diversas redes neurais e exerce um papel de controle cognitivo em diferentes domínios funcionais, como espacial, verbal e visual (57). Além disso, o consumo excessivo de alimentos densos em caloria parece contribuir para uma redução do controle modulatório sobre as regiões de recompensa do córtex, sistema dopaminérgico e controle cognitivo. Com isso, pode ser desencadeada uma disfunção do córtex pré-frontal, o qual apresenta uma capacidade de autorregulação dietética e, conseqüentemente, um aumento a do consumo exacerbado de alimentos palatáveis, ricos em açúcar e gordura. Dessa forma, o consumo crônico e excessivo destes alimentos pode promover uma desregulação funcional do córtex cerebral e do sistema dopaminérgico, seguida de uma maior probabilidade de desenvolvimento de obesidade e também, deficiências neurocognitivas e neurofisiológicas (58).

O hipotálamo tem atraído muita atenção devido ao seu envolvimento no surgimento e manutenção do fenótipo obeso. Ele compreende o núcleo ventromedial, núcleo arqueado, núcleo hipotalâmico dorsomedial e núcleo paraventricular. Dentro do núcleo arqueado são encontradas duas populações neuronais distintas, como os neurônios NPY/AgRP e os neurônios POMC/CART, que estão envolvidos no balanço energético e na regulação do peso corporal (59,60). Portanto, o hipotálamo é considerado uma região-chave na regulação energética devido à sua participação na regulação dos hormônios endócrinos e, com isso, controle do estado nutricional e homeostase energética do organismo (61). Sinais inflamatórios da periferia têm entrada facilitada no terceiro ventrículo, nas regiões circunventriculares e na eminência mediobasal, que têm proximidade com o hipotálamo. De fato, os ácidos graxos saturados de cadeia longa derivados

da dieta têm uma passagem ativa para o hipotálamo e estimulam uma resposta inflamatória pela ativação da sinalização do TLR-4 (43,62,63). Estudos sugerem que a regulação do metabolismo sistêmico e do balanço lipídico tem uma importante contribuição do SNC. Ainda, as células gliais podem fornecer suporte metabólico aos neurônios. Sendo assim, os astrócitos estão envolvidos na detecção de ácidos graxos e no metabolismo lipídico. Estudos demonstram que os ácidos graxos de cadeia longa estimulam os astrócitos hipotalâmicos que possuem alta capacidade de mediar a oxidação lipídica, com aparente envolvimento da proteína cinase ativada por AMP (AMPK) (61,64). O consumo exacerbado de ácidos graxos dietéticos, resulta em níveis elevados de corpos cetônicos no hipotálamo, alterando a homeostase energética (65,66). Além disso, estudos realizados em modelos experimentais de obesidade demonstraram que o estímulo do TLR-4 promove a síntese das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Como consequência, há ativação das vias de estresse do retículo endoplasmático, que resulta em sinalização pró-inflamatória e gliose no hipotálamo (56,67,68).

Em relação ao hipocampo, esta é uma região do encéfalo conhecida por mediar a cognição e a memória (69,70). Estudos em humanos e roedores demonstraram que a dieta rica em gordura e/ou açúcar afeta a memória dependente do hipocampo (71–73), levando a déficits cognitivos, como comprometimento dos mecanismos de aprendizagem e memória, e também dificuldade de concentração (72–75). Em estudos realizados com roedores que receberam uma dieta rica em gordura e açúcar foi observado uma disfunção no hipocampo, associado à perda da integridade da barreira hematoencefálica (BHE), seguida de um aumento da sinalização inflamatória com ativação das células da glia e comprometimento da plasticidade sináptica (15,74).

Cai e colaboradores estudaram os efeitos negativos da obesidade no desempenho cognitivo e os mecanismos biológicos envolvidos. Seus achados sugerem que a hiperglicemia e a hiperlipidemia induzidas pela obesidade reduzem a expressão de proteínas relacionadas à cognição, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e sinaptofisina, levando à disfunção de memória e

aprendizagem (76). O BDNF é uma proteína da família das neurotrofinas, essencial para o desenvolvimento, manutenção, sobrevivência neuronal, além de modular a função cognitiva e a plasticidade sináptica. Além disso, é considerado um regulador chave da transmissão sináptica, principalmente no hipocampo e neocórtex (77,78). A sinaptofisina é uma proteína presente nas vesículas pré-sinápticas e assim, participa da modulação da liberação de neurotransmissores. Além disso, é usada como um marcador da distribuição e densidade das sinapses (79–81). Foi demonstrado uma diminuição da expressão de sinaptofisina no hipocampo de roedores com déficit cognitivo induzido pela obesidade (82–84).

Estudos recentes reportam uma maior propensão ao desenvolvimento de distúrbios neurodegenerativos e comportamentais em indivíduos obesos (85–88). Os mecanismos envolvidos ainda são indeterminados, porém, um número crescente de evidências indica que o elo entre obesidade e disfunção neurológica pode ser a inflamação sustentada presente nestes indivíduos. Assim, a ativação de vias inflamatórias pode contribuir para a ocorrência de prejuízos nas funções cognitivas (89). Um aspecto importante a ser considerado é o impacto da CAF sob os marcadores de neuroplasticidade no SNC. Já foi descrito que existe uma interação recíproca entre a microbiota intestinal e o SNC. Essa comunicação bidirecional é conhecida como eixo intestino-cérebro, a qual é regulada por meio de sinais imunológicos e neuroendócrinos (90–92). Vários estudos relataram a associação entre disbiose intestinal e distúrbios neurológicos, como desordens cognitivas, doença de Alzheimer (15), doença de Parkinson (93), transtornos do espectro autista (94) e transtornos de humor (95).

1.4 Barreira intestinal e barreira hematoencefálica

O complexo juncional epitelial é formado pelas junções oclusivas, junções aderentes e desmossomos. As junções oclusivas são essenciais para estabelecer uma barreira entre os diferentes compartimentos corporais e, também, são responsáveis pela regulação seletiva do transporte de íons, solutos e peptídeos do lúmen para a mucosa intestinal e corrente sanguínea. Além disso, as junções apresentam proteínas que se encontram na região paracelular (claudina e ocludina)

e na região intracelular (zônula ocludens, ZO-1, ZO-2 e ZO-3), que estão ligadas ao citoesqueleto (96–98).

A família claudina compreende 27 proteínas expressas em humanos reconhecidas até o momento. As diferentes isoformas das claudinas apresentam padrões de expressão específicos para cada tecido, onde desempenham propriedades funcionais diferentes (99–101). Desse modo, as claudinas controlam a homeostase pela formação de poros entre as células epiteliais para regulação de íons e solutos, e também, pela vedação e regulação da função da barreira (101,102). Além disso, já foi relatado que a composição e distribuição das claudinas variam espacialmente ao longo do comprimento do intestino. Ainda, existe uma remodelação destas proteínas que ocorre em poucos dias durante a vida útil do epitélio intestinal (100,101,103). No intestino de rato adulto foi identificada a expressão gênica de claudina-1, -2, -3, -4, -5 -7, -8, -9, -10, -11, -12, 13, -14, - 15, - 17 e -18 (104,105). Mediadores inflamatórios alteram a regulação transcricional, tráfego endocítico, bem como o direcionamento e a retenção de claudinas nas junções oclusivas. Assim, há uma alteração da expressão das claudinas que pode resultar em disfunção da barreira epitelial, perturbando a homeostase da mucosa (99,101). A estrutura das ocludinas é similar às claudinas, sendo formadas por quatro domínios transmembranas e duas alças extracelulares (106). Já as proteínas ZOs são associadas ao citoesqueleto e tem como função interagir com claudinas, ocludinas e moléculas de adesão juncional e ancorar estas proteínas ao citoesqueleto de actina (100).

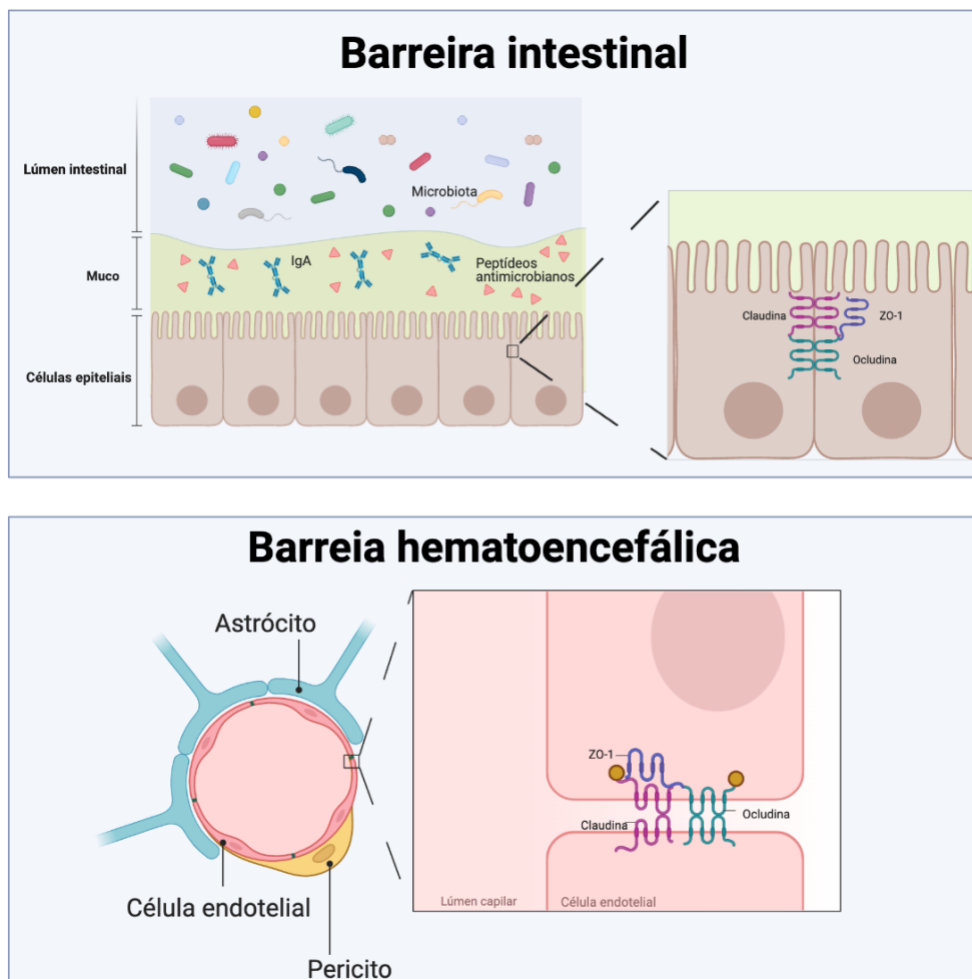
O sistema de barreira intestinal depende da interação entre vários componentes que regulam as propriedades da barreira epitelial. Além das junções intracelulares, existe o envolvimento da camada de muco, imunoglobulina A e peptídeos antimicrobianos (107). Estudos demonstram que a barreira intestinal é dinâmica e altamente responsiva às dietas (107–109). Foi mostrado que camundongos que receberam uma dieta rica em glicose ou frutose por 12 semanas apresentaram endotoxemia e aumento da permeabilidade intestinal. Esses achados foram evidenciados por um aumento dos níveis de citocinas inflamatórias como

TNF- α e IL-1 β e uma menor expressão proteica de ZO-1 e ocludina no cólon (108). Snelson e colaboradores demonstraram que camundongos após um consumo prolongado de alimentos processados apresentaram uma maior permeabilidade da barreira intestinal no cólon. A disfunção da barreira foi associada a um aumento da expressão gênica de claudina-1 e -5, enquanto que ZO-1 e ocludina não apresentaram alterações de expressão. Os mecanismos exatos subjacentes ao comprometimento da barreira intestinal não estão completamente elucidados. Entretanto, a alteração da microbiota intestinal induzida por dietas ricas em glicose e frutose parece estar envolvida (109). Além disso, a endotoxemia metabólica causada pelo aumento de LPS gera uma inflamação sistêmica de baixo grau e desempenha um papel importante na patogênese da obesidade. O LPS consegue entrar na circulação por difusão paracelular no epitélio intestinal (110) e ainda, pode ser incorporado às micelas de ácidos biliares devido à sua estrutura lipídica A, que apresenta uma característica insolúvel. Assim, é absorvido pelas células epiteliais e agregado aos quilomícrons no período pós-prandial (111). Estudos mostram que a dieta rica em gordura prejudica a estrutura das junções oclusivas e induz um aumento da permeabilidade intestinal em roedores (98,112,113). Um dos possíveis mecanismos envolvidos é a ativação de células imunes da mucosa por meio dos ácidos graxos saturados de cadeia longa provenientes da dieta. Com isso, ocorre a liberação de mediadores inflamatórios como IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 e proteases, seguida de uma disfunção das proteínas de barreira (114).

A BHE é uma estrutura dinâmica e especializada, formada pelas células endoteliais dos vasos sanguíneos do encéfalo, conectadas por junções oclusivas e aderentes, juntamente com pericitos, membrana basal e pés astrocitários que associados a microglia e neurônios compõem as unidades neurovasculares. Estes garantem o ajuste paracelular entre as células endoteliais, formam uma barreira fisiológica e garantem a circulação controlada de macromoléculas. Dessa forma, restringem o acesso de patógenos exógenos e outras substâncias circulantes ao SNC (97,106). Dentre as proteínas das junções oclusivas envolvidas, a ZO-1, a claudina-5 e a ocludina são reconhecidas como marcadores de integridade da BHE (99,101,115). Além disso, os pés astrocitários justapostos aos vasos sanguíneos

contribuem na manutenção e formação da BHE por reforçarem as junções oclusivas, mas também, pela expressão de transportadores específicos e de forma polarizada (116). A Figura 2 mostra um esquema da estrutura das barreiras intestinal e hematoencefálica.

Figura 2. Estrutura das barreiras intestinal e hematoencefálica. O sistema de barreira intestinal depende da interação entre vários componentes que regulam as propriedades da barreira epitelial. Além das proteínas das junções oclusivas ZO-1, claudina-5 e ocludina, existe o envolvimento da camada de muco, imunoglobulina A e peptídeos antimicrobianos. A barreira hematoencefálica é composta pela presença das junções oclusivas e reforçada pelos pés astrocitários, o que garante o ajuste paracelular entre as células endoteliais (fonte própria autoria).



Sendo assim, a BHE desempenha um papel de restrição e proteção contra compostos tóxicos advindos da circulação. Entretanto, ao mesmo tempo, permite a passagem bidirecional de moléculas de forma regulada afim de garantir o fornecimento de nutrientes essenciais para a função e manutenção da homeostase cerebral (117,118). Além disso, a BHE é altamente responsiva à inflamação periférica causada pela obesidade e pelo padrão alimentar, que são capazes de modular a expressão das proteínas de junção oclusivas (15,119,120). Similarmente, o consumo crônico de dieta hiperlipídica e hipercalórica altera a microbiota intestinal, e parece impactar negativamente o eixo intestino-cérebro (121,122).

A disbiose é uma condição de alteração qualitativa e quantitativa da microbiota intestinal. Esta condição resulta em uma alteração da permeabilidade intestinal devido à ruptura das junções oclusivas epiteliais (123,124). Essa ruptura resulta em extravasamento de LPS, ativação do receptor TLR-4 e ativação da resposta inflamatória. Deste modo, é sustentado pela literatura que o consumo crônico de dieta hiperlipídica induz uma disbiose na microbiota intestinal que, por sua vez, resulta em um quadro inflamatório, alteração da permeabilidade da barreira intestinal e endotoxemia metabólica (24,122,125). Esta condição pode promover alterações na integridade da BHE e, conseqüentemente, retração dos pés atrociários. Dessa forma, facilita a passagem de citocinas e quimiocinas, células do sistema imune, endotoxinas e ácidos graxos livres, propiciando o desenvolvimento de neuroinflamação e, comprometendo a função neuronal (56,117,120,126).

1.5 Microbiota intestinal

Nos últimos anos, o estudo do intestino ganhou atenção entre os pesquisadores e se tornou um importante órgão-alvo a ser considerado nos desfechos da obesidade. Isso se deve, principalmente, aos efeitos da dieta neste órgão (24,127). Embora o intestino delgado tenha um papel importante na absorção e digestão da maioria dos nutrientes da dieta, o intestino grosso tem um papel notável na absorção de água e sais minerais na corrente sanguínea (128). As medidas de altura de vilosidades e profundidade das criptas intestinais são consideradas marcadores de morfologia e capacidade de absorção (129). Além

disso, alguns estudos relataram que o tipo de nutrientes provenientes da dieta pode influenciar na morfologia das células epiteliais intestinais e contribuir para alterações funcionais, como diferenciação e proliferação celular (127,129,130).

O cólon intestinal é habitado por diferentes espécies de microrganismos, constituído por uma densa população de trilhões de bactérias, arqueas, vírus, fagos, leveduras e fungos. Existe uma interação bilateral complexa entre os seres humanos e sua microbiota, a qual tem um papel crucial no controle homeostático do corpo, por participar da regulação das vias imunológica, endócrina e neural. Com isso, é estabelecida uma relação simbiótica (131–134). Ao longo do trato intestinal existe uma variação da composição da microbiota relacionado ao pH, tensão de O₂ e disponibilidade de substratos. O intestino delgado é um ambiente desafiador para os microrganismos devido às altas concentrações de bile e também ao curto tempo de trânsito do alimento, sendo em torno de 3 a 5 horas. Em relação ao intestino grosso, por apresentar um pH neutro a levemente ácido e taxas de fluxo mais lentas, é a região intestinal responsável por abrigar a maior parte da comunidade bacteriana, dominada principalmente por bactérias anaeróbicas obrigatórias (135). Dessa forma, existe um gradiente quantitativo crescente da microbiota, associado a uma diminuição progressiva de bactérias aeróbicas em benefício de bactérias estritamente anaeróbicas (18).

Em relação à taxonomia, as bactérias são classificadas de acordo com o filo, classe, ordem, família, gênero e espécie. Dentre os filos microbianos mais dominantes presentes no intestino estão Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria e Verrucomicrobia. Cerca de 90 % é representado pelos filos Firmicutes e Bacteroidetes (136).

O filo Firmicutes é composto por mais de 200 gêneros diferentes. Destes, os gêneros relevantes incluem os *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium* e *Roseburia* (136,137). O gênero *Lactobacillus* é composto por diversas cepas benéficas com propriedades promotoras de saúde, contribuindo para o metabolismo do hospedeiro (138). O gênero *Clostridium* corresponde a 95 % dos gêneros presentes no filo Firmicutes

(136,137). Algumas espécies bacterianas do gênero *Clostridium* exercem um efeito benéfico e contribuem para homeostase intestinal. No entanto, outras espécies patogênicas como *C. difficile*, *C. perfringens*, *C. butyricum*, *C. tertium*, *C. paraputrificum* e *C. ramosum* apresentam potenciais riscos à saúde do hospedeiro (139,140). Os gêneros *Eubacterium*, *Faecalibacterium* e *Roseburia* são produtores de butirato (137). A espécie *Roseburia intestinalis* é uma bactéria anaeróbica que desempenha um papel benéfico na manutenção da barreira epitelial, apresenta efeitos anti-inflamatórios e regula a homeostase energética através da produção de metabólitos, como o butirato e flagelina (141,142). Da mesma forma, a espécie bacteriana *Faecalibacterium prausnitzii* exerce um papel importante na promoção de saúde intestinal, relacionado às suas propriedades anti-inflamatórias (143,144). O gênero *Blautia*, da família *Lachnospiraceae* do filo Firmicutes tem sido muito estudado nos últimos anos. De acordo com análises fenotípicas e filogenéticas, algumas espécies dos gêneros *Clostridium* e *Ruminococcus* foram reclassificadas como *Blautia*. Sendo assim, até o momento, existem 20 novas espécies válidas neste gênero, que é composto por bactérias anaeróbicas que apresentam propriedades benéficas à saúde do hospedeiro. Enquanto alguns estudos relatam seus efeitos benéficos (145), outros apontam efeitos deletérios associados à maior abundância de *Blautia* (146,147). Dessa forma, ainda não há um entendimento abrangente sobre este gênero.

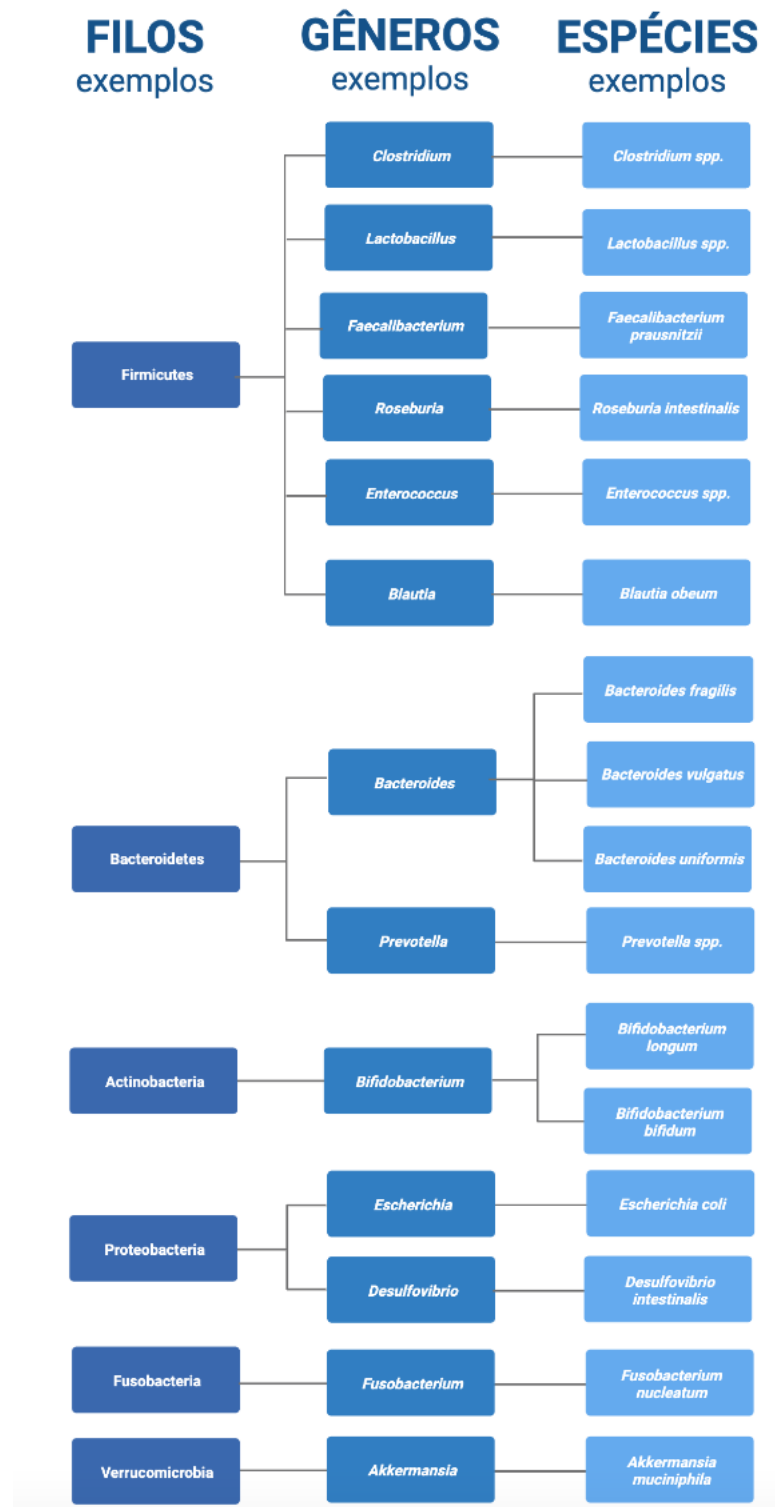
O filo Bacteroidetes consiste em gêneros predominantes, como *Bacteroides*, *Prevotella* e *Xylanibacter* que são responsáveis por degradar uma variedade de glicanos complexos (136,137). O gênero *Bacteroides* é o mais prevalente do filo Bacteroidetes no intestino humano (128). Este gênero é representado por diversas espécies bacterianas que estão envolvidas na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (148). Em contrapartida, *Prevotella* é um gênero diverso de bactérias anaeróbicas gram-negativas que inclui mais de 50 espécies bacterianas. Embora existam relatos conflitantes em relação aos efeitos deste gênero na saúde do hospedeiro, parece que estar relacionado a um efeito pró-inflamatório e contribuir para o estado de inflamação crônica de baixo grau observado em doenças metabólicas (149,150).

O filo Actinobacteria é proporcionalmente menos abundante, sendo representado principalmente pelo gênero *Collinsella* e *Bifidobacterium* (136,137). O gênero *Bifidobacterium* é composto por várias espécies bacterianas benéficas que contribuem para o metabolismo do hospedeiro (138). Diversos estudos na literatura relatam seus potenciais efeitos promotores de saúde e sua utilização como suplemento probiótico de diferentes espécies bacterianas (151,152).

O filo Proteobacteria é composto por bactérias anaeróbias facultativas, sendo os gêneros mais comuns *Escherichia* e *Desulfovibrio* (136,137). Os estudos sugerem que o aumento da abundância de Proteobacteria está associado a um desequilíbrio da microbiota intestinal, sendo considerado um potencial marcador de disbiose (153). Já foi relatada a maior prevalência de Proteobacteria associadas a uma HFD tanto em humanos quanto em modelo animal (138,154,155). Além disso, foi proposto que a endotoxemia desencadeada pelo consumo de dietas ricas em gordura poderia estar relacionada principalmente com uma maior abundância das proteobactérias gram-negativas (135). O gênero *Desulfovibrio* inclui bactérias redutoras de sulfato (135,137). Nesse caso, o sulfato é reduzido a sulfeto de hidrogênio, que pode contribuir na inflamação intestinal (156).

O filo Verrucomicrobia, foi descoberto recentemente e inclui o gênero *Akkermansia* (136,137). A *Akkermansia muciniphila* é uma espécie benéfica que auxilia na manutenção da homeostase metabólica, aumenta a densidade de células caliciformes, estimula a produção de mucina e melhora a integridade da barreira intestinal (157–160). De fato, estudos descreveram os efeitos promotores da saúde da *Akkermansia muciniphila* no metabolismo energético e nas funções metabólicas, como sensibilidade à insulina, dislipidemia e até mesmo nos déficits cognitivos (161–163). A Figura 3 mostra um esquema com exemplos da organização taxonômica da microbiota intestinal.

Figura 3. Esquema da composição taxonômica da microbiota intestinal. Na caixa são citados exemplos de gêneros e espécies pertencentes aos Filos Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria e Verrucomicrobia (fonte própria autoria).



Por fim, embora não exista uma definição de “microbiota saudável” devido à alta variabilidade de espécies bacterianas presentes na microbiota intestinal, alguns padrões comuns podem ser identificados em níveis taxonômicos de filos em todos

os vertebrados (161,164). Nos últimos anos, o equilíbrio do ecossistema microbiano intestinal vem sendo denominado de eubiose. Esse conceito da homeostase da microbiota intestinal é caracterizado por uma maior prevalência de espécies potencialmente benéficas em comparação a espécies potencialmente patogênicas (165,166). No geral, é consistentemente descrito que uma maior diversidade microbiana caracteriza uma microbiota intestinal saudável (161,167). A menor diversidade da microbiota intestinal observada na obesidade está associada a uma dieta obesogênica tanto em humanos quanto em animais (20,168). Em contrapartida, uma alimentação saudável rica em fibras alimentares e micronutrientes pode estabelecer a homeostase intestinal. Esta condição está relacionada à diversidade microbiana, barreira intestinal íntegra e um bom funcionamento do sistema imune. Além disso, a diversidade microbiana promove aumento da produção de AGCC e defensinas, melhora no metabolismo lipídico, aumento da sensibilidade à insulina, produção de neurotransmissores e equilíbrio na função do SNC pela modulação do eixo intestino-cérebro (169–172).

A composição e diferenciação da microbiota intestinal é modulada por diversos fatores como ambiente, consumo alimentar, genética, uso de antibioticoterapia, estresse e infecções que podem afetar o metabolismo e a imunidade inata (131,133,134). A relação simbiótica entre microbiota-hospedeiro é dinâmica e complexa. Enquanto o hospedeiro fornece substratos alimentares para os micro-organismos, a microbiota intestinal contribui em diversos processos fisiológicos do hospedeiro (131,132). Sendo assim, a microbiota intestinal está envolvida na resposta imune, por contribuir na maturação do tecido linfóide associado ao intestino (GALT) e na prevenção da colonização de patógenos (133,173,174). Além disso, a microbiota intestinal está envolvida na digestão e regulação do metabolismo energético do hospedeiro. Esse envolvimento pode ser via absorção, extração e síntese de muitos nutrientes e metabólitos, como aminoácidos, ácidos biliares, lipídios, AGCC e vitaminas (18,175). Nesse contexto, a microbiota intestinal parece ser capaz de contribuir para a progressão e desenvolvimento da obesidade (169,175,176). Estudos prévios sugerem que várias doenças estão associadas a um determinado perfil de microbiota (177–179). Na

literatura, os estudos demonstraram que camundongos axênicos que receberam um transplante fecal de doadores obesos, eram capazes de extrair mais energia dos alimentos provenientes da dieta. Consequentemente, ganharam mais peso e armazenaram mais gordura quando comparados a camundongos axênicos que receberam um transplante fecal de doadores magros (180,181). Além disso, o transplante fecal de uma microbiota intestinal em disbiose contribui para o desenvolvimento de distúrbios relacionados à obesidade (182,183). Com isso, alguns pesquisadores levantaram a hipótese de que camundongos livres de germes eram resistentes à obesidade induzida pela dieta (184). No entanto, outros já comprovaram o contrário (185,186).

A regulação do metabolismo energético do hospedeiro depende da comunicação entre o intestino e o cérebro (187). O eixo intestino-cérebro é um sistema de comunicação bidirecional, mediado por sinais imunológicos, hormonais e neurais, entre o intestino e o cérebro (169,175,188). Assim, a microbiota intestinal contribui para a regulação energética, apetite, saciedade, além de modular o comportamento alimentar (187). Este eixo é composto pelo SNC, inervação entérica que abrange as fibras extrínsecas do sistema nervoso autônomo (SNA) e neurônios intrínsecos do sistema nervoso entérico (SNE), eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e microbiota intestinal. Desse modo, a comunicação bidirecional é estabelecida a partir das fibras vagais e espinhais das inervações extrínsecas do trato gastrointestinal (TGI), que conectam o intestino ao SNC, enquanto o SNC envia fibras eferentes simpáticas e parassimpáticas ao TGI (189–191). Existem diversos mecanismos pelos quais a microbiota intestinal pode contribuir na regulação do eixo intestino-cérebro, entre eles: (i) modulação de mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas) e endócrinos (glicocorticoides); (ii) sinalização neural (nervo vago e sistema nervoso entérico); (iii) metabolização microbiana de substratos alimentares e produção de AGCC; e (iv) síntese e regulação de compostos neuroativos (neurotransmissores) (192–195). A participação da microbiota no eixo HPA pode estar relacionada a processos de neurodesenvolvimento, regulação das funções cerebrais, desordens neurodegenerativas e condições neuropsiquiátricas. Além disso, o eixo HPA está

envolvido na regulação de emoções, de humor, de funções imunológicas e de resposta ao estresse. Portanto, a desregulação do eixo HPA, a partir da produção exacerbada de glicocorticoides, estabelece um perfil pró-inflamatório que pode gerar neuroinflamação (133,169,196).

1.6 Ácidos graxos

A microbiota intestinal utiliza substratos alimentares para sua manutenção e reprodução (174). As bactérias colônicas anaeróbicas comensais produzem metabólitos funcionais a partir dos macronutrientes e micronutrientes providos da dieta. Sendo assim, os carboidratos, proteínas e lipídios são metabolizados e resultam na formação de diferentes metabólitos, tais como AGCC, ácidos biliares e substâncias neuroativas (174,197). Os principais filos de bactérias envolvidos são Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Verrucomicrobia (198). Os AGCC, provenientes da metabolização de fibras alimentares altamente fermentáveis e amido resistente beneficiam seu hospedeiro (197). Os principais representantes são acetato, butirato e propionato. Os ácidos graxos de cadeia ramificada (*branched-chain fatty acids*, BCFA), como isobutirato, valerato e isovalerato, também podem ser formados em quantidades menores por fermentação bacteriana de aminoácidos de cadeia ramificada, como valina, leucina e isoleucina (148,199).

Os efeitos benéficos dos AGCC no metabolismo do hospedeiro já foram amplamente estudados na literatura. Estes metabólitos contribuem com recursos nutricionais, metabolismo energético, produção de hormônios intestinais e lipogênese (128,132,177). Ainda, estão envolvidos na manutenção da integridade do epitélio intestinal, exercem um papel anti-inflamatório e regulam a função imune pela síntese e diferenciação das células T reguladoras (Treg). Além disso, regulam a saciedade e parecem estar envolvidos na regulação neuroimunoendócrina (132,200,201).

O acetato representa o AGCC mais abundante no organismo, sendo encontrado em maiores concentrações no sangue e tecidos periféricos (176,202). Porém, também está presente no SNC, onde é utilizado como fonte de energia pelas

células gliais (203). É um metabólito sintetizado pelo filo Bacteroidetes essencial para o crescimento de diversas bactérias (128). Além disso, este metabólito possui um envolvimento no metabolismo do colesterol e na lipogênese (176). O acetato é o principal AGCC sintetizado pelas bactérias intestinais e exerce um efeito importante na regulação energética do organismo (161,204). Isso ocorre devido a sua capacidade de atravessar a BHE, e assim, suprime o apetite diretamente no centro de regulação do apetite hipotalâmico. Um estudo em camundongos que receberam acetato pela via intraperitoneal foi observado mudanças nos perfis de expressão gênica de neuropeptídeos reguladores que favorecem a supressão do apetite, evidenciado por um aumento na expressão de POMC, juntamente com a supressão de AgRP no hipotálamo. Estes achados sugerem um efeito direto deste metabólito no controle do apetite (204).

O butirato é um metabólito do filo Firmicutes, produzido pelas famílias *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Erysipelotrichaceae* e *Clostridiaceae* (128,198). Produzido por bactérias anaeróbicas obrigatórias, principalmente dos gêneros *Faecalibacterium*, *Eubacterium* e *Roseburia* (202). Este metabólito é preferencialmente utilizado na mucosa intestinal e contribui para a manutenção da condição anaeróbica no lúmen intestinal, prevenindo a disbiose. Isso ocorre pela ativação do receptor γ ativado pelo proliferador de peroxissoma (PPAR- γ), que resulta na beta-oxidação e consumo do oxigênio (205). O butirato também contribui para o controle do balanço energético pela regulação da saciedade (176,206), é essencial para a homeostase imunológica do hospedeiro devido às suas respostas anti-inflamatórias (207). Além disso, é utilizado como fonte de energia para os colonócitos (202,207). Dessa forma, desempenha um papel importante na manutenção da integridade epitelial no intestino (200).

O propionato é produzido pelas bactérias do filo Bacteroidetes (198). Este metabólito participa da manutenção da função imunológica pela regulação das células T-reg. Além disso, exerce um efeito anti-obesogênico por estimulação de hormônios anorexígenos. O propionato também regula a gliconeogênese pela

ligação aos receptores de ácidos graxos livres (FFAR). Como consequência, gera efeitos benéficos na homeostase energética e da glicose (202,207,208).

Os AGCC são agonistas dos receptores GPR-41, GPR-43, FFAR expressos nas células L enteroendócrinas intestinais. Quando estes receptores são estimulados pelos AGCC, é observado um aumento da produção de hormônios intestinais como GLP-1, PYY e colecistocinina (CCK). Estes sinalizam o núcleo do trato solitário (NTS) no encéfalo pelo nervo vago ou pela secreção direta no sistema circulatório (187,205,209). As informações são distribuídas para o núcleo arqueado (ARC) no hipotálamo que, por sua vez, é o centro de regulação do apetite e balanço energético. Por tratar-se de incretinas anorexígenas, estas estimulam a saciedade (132,133,187). Assim, durante a ingestão alimentar, os nervos aferentes vagais gastrointestinais transmitem sinais de saciedade ao encéfalo, através de mecanismos químicos (mediadores de saciedade como CCK, serotonina, GLP-1 e PYY) e mecânicos (distensão abdominal). Além disso, a microbiota intestinal produz neurotransmissores, tais como serotonina, ácido γ -aminobutírico (GABA), dopamina e acetilcolina. Estes entram no sistema circulatório e atravessam a BHE, exercem diferentes efeitos e são capazes de modular o metabolismo do hospedeiro e regular o apetite diretamente pela estimulação vagal, ou indiretamente por mecanismos neuroimunoendócrinos (174,187,201). Nesse contexto, estes neurotransmissores também estão envolvidos na modulação comportamental, cognitiva e neuroproteção (17,187,210).

A regulação da homeostase intestinal e imunológica envolve diversos mecanismos mediados pela interação com os receptores GPR41, GPR43 e GPR109A, e inibição da histona desacetilase (HDAC) (200,208,211). Os AGCC fornecem substrato energético para as células epiteliais intestinais que, por sua vez, contribuem para a integridade da barreira. Além disso, estes metabólitos são capazes de estimular a produção de mucina e modular o sistema imunológico pela sinalização dos receptores GPR41, GPR43, GPR109A (205).

Existem diversos mecanismos pelos quais os AGCC são capazes de regular a função imune. Estes metabólitos são capazes de ativar o receptor GPR43, o qual

é expresso em células Treg intestinais. Com isso, há um aumento da proliferação destas células, e também, síntese de interleucina-10 (IL-10) (208). Os AGCC modulam a ativação dos inflamassomas AIM2 e NLRP3, que resulta em produção de interleucina-18 (IL-18) e melhora na função da barreira epitelial. Além disso, a ativação do inflamassoma NLRP6, seguida de síntese de IL-18 estão envolvidos na regulação da produção de peptídeos antimicrobianos intestinais (211,212).

Por outro lado, o butirato é capaz de ativar o receptor GRP109A, expresso em células dendríticas e macrófagos. Com isso, promove um efeito anti-inflamatório por induzir a síntese de IL-10. Ainda, é capaz promover a síntese das células Treg colônicas, até mesmo atuar diretamente nestas células e gerar uma indução do fator de transcrição FOXP3, juntamente com uma inibição da HDAC (208,213,214). Desse modo, os inibidores de HDAC aumentar a produção das células Treg e promovem a ação supressora no fator nuclear-kB (NF-kB) (208,212).

Foram propostas diferenças na produção de AGCC entre indivíduos obesos e magros devido à sua comunidade bacteriana (215). Tais diferenças podem estar associadas à microbiota obesa ter maior capacidade de extrair energia da dieta e, consequentemente, produzir mais AGCCs. Por sua vez, essa energia poderia ser armazenada como gordura e promover ganho de peso (132,215). Enquanto isso, outros estudos não relataram relação entre a abundância intestinal de AGCC com obesidade ou distúrbios metabólicos relacionados (132,215,216). Vale ressaltar que estes estudos demonstraram níveis mais elevados de AGCC em indivíduos obesos quando comparados a indivíduos magros quando dosados nas fezes (216,217). Este aumento na concentração de AGCC nas fezes não necessariamente reflete um aumento na produção de AGCC ou até mesmo a quantidade disponível no organismo destes metabólitos. Dessa forma, esta teoria da extração de energia é mais complexa do que a simples variação da concentração de AGCC nas fezes (132).

O consumo de dieta hiperlipídica por camundongos causa diminuição da sensibilidade dos nervos sensoriais intestinais que sinalizam ao hipotálamo (121). A dieta de padrão ocidental foi associada a uma disbiose da microbiota intestinal,

menor abundância de bactérias benéficas e diminuição dos níveis de AGCC (17). Neste contexto, o desequilíbrio na concentração de AGCC no lúmen intestinal pode aumentar a permeabilidade intestinal e diminuir a síntese de mucina. Além disso, a diminuição de butirato é seguida por um aumento da quantidade de oxigênio presente no lúmen intestinal, facilitando assim, a proliferação de bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Como consequência de tais alterações, há um aumento de PAMPs e citocinas pró-inflamatórias, que chegam na circulação sanguínea e desencadeiam um estado inflamatório de baixo grau (201,205).

1.7 Zinco

O Zinco (Zn) é um micronutriente amplamente distribuído em todo o corpo humano em pequenas concentrações. É essencial para manutenção da saúde devido a sua ampla atividade biológica (218). A recomendação de ingestão diária para homens adultos corresponde a 11 mg, e para mulheres adultas corresponde a 8 mg (219). Este mineral é encontrado em alimentos de origem animal (carne, leite e derivados), cereais de grãos integrais, feijões, amêndoas, castanhas, semente de abóbora e nozes. Entretanto, a ingestão alimentar não garante uma boa biodisponibilidade e utilização celular de zinco, visto que podem interagir quimicamente com outras substâncias, como cálcio, fibras, fitatos e oxalatos, interferindo negativamente na absorção (220,221). Em relação a prevalência da deficiência de zinco, estima-se que 17,3% da população mundial apresenta risco de ingestão inadequada deste micronutriente (222,223). Como consequências da deficiência de zinco, são observadas alteração no paladar e olfato, alterações fisiológicas como hipogonadismo, dano oxidativo, alterações do sistema imune, aumento de suscetibilidade a infecções, distúrbios mentais e alteração no desenvolvimento cognitivo (224,225).

A regulação homeostática do Zn no organismo depende da ação das metalotioneínas e de seus transportadores, tais como proteínas relacionadas com Zrt-Irt (*Zrt-Irt-like proteins*, ZIP) e o transportador de zinco (*zinc transporter*, ZnT). As metalotioneínas são proteínas localizadas no citosol das células eucarióticas responsáveis pela regulação da concentração citosólica de diferentes metais. Estas

proteínas ligam-se ao Zn com baixa afinidade, em contrapartida os transportadores mediam a compartimentalização deste mineral nas vesículas e organelas, regulando seu armazenamento e disponibilização para as proteínas que requerem Zn para exercerem suas funções (226–228).

A família ZIP é composta por 14 transportadores que conduzem o Zn do meio extracelular ou de organelas em direção ao citosol. Enquanto que a família ZnT compreende 9 transportadores responsáveis por transportar o Zn do citosol em direção ao interior de organelas ou para o meio extracelular. Desse modo, esses transportadores atuam de forma coordenada ou independente e desempenham um papel essencial para manutenção da concentração do Zn (225,227,228).

O Zn é essencial em diversos processos bioquímicos e enzimáticos por participar de mais de 300 reações enzimáticas. Este íon intracelular possui um papel importante na função celular adequada, como diferenciação crescimento, divisão e transporte celular. Além disso, atua nos sistemas imunológico, endócrino e neural (229,230). Já foi estabelecido que o Zn colabora na manutenção dos mecanismos homeostáticos atuando como cofator para diversas enzimas, como DNA e RNA polimerases, DNA ligases e histonas desacetilases. Desse modo, participa no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (218,220). Este mineral está envolvido na síntese e armazenamento e da insulina. O ZnT8 é responsável por transportar e armazenar o Zn dentro dos grânulos secretores de insulina (227,231). Em um estudo com camundongos obesos que receberam HFD foi observado que a suplementação de zinco melhora a tolerância à glicose e secreção de insulina (232). Além disso, o Zn faz parte das dessaturases e elongases e parece influenciar no perfil de ácidos graxos. De fato, um estudo em ratos após a suplementação de Zn relatou diferentes mudanças na quantidade de ácidos graxos saturados (47). Em estudo prévio realizado em nosso laboratório utilizando os mesmos animais do presente estudo, foi observado que o zinco exerceu efeitos benéficos sobre o perfil lipídico, glicemia de jejum e níveis de insulina (30). Neste contexto, a suplementação de Zn desempenha um papel importante na disfunção metabólica e pode contribuir para o comprometimento neurológico relacionado à obesidade (30,233,234).

A participação do Zn na função imune, resposta inflamatória, equilíbrio redox e no auxílio à manutenção da integridade das barreiras são essenciais para a homeostase do organismo (107,229,235). Nas criptas das vilosidades do intestino delgado, as células de Paneth requerem o Zn para a secreção de peptídeos antimicrobianos. Estes são responsáveis por regular a imunidade inata do intestino delgado e regular a microbiota no lúmen intestinal (236,237). Além disso, este mineral é necessário para o desenvolvimento e funcionamento do sistema imunológico pela regulação da produção e maturação de linfócitos T e B, macrófagos, neutrófilos e células natural killer. Desse modo, o efeito anti-inflamatório do Zn ocorre pela inibição da via NF- κ B, e subsequente, regulação dos fatores de transcrição envolvidos na expressão de citocinas inflamatórias, como IL-6, IL-1 β e TNF- α (229,238). O papel antioxidante do Zn pode ser mediado pela interação direta com resíduos de aminoácidos, impedindo a modificação oxidativa de proteínas. Ainda, o Zn participa da estrutura de antioxidantes enzimáticos (Cu, Zn-superóxido dismutase) e síntese de metalotioneínas, como também na modulação da sinalização de fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) (229,239).

Além disso, estudos em animais e *in vitro* mostram que o Zn pode exercer um efeito protetor na barreira intestinal. Os mecanismos não estão totalmente elucidados, mas parece que a proteção mediada pelo zinco se deve à estimulação do GPR39, um receptor sensível ao Zn envolvido na regulação da barreira (107,240). Além disso, o Zn melhorou significativamente a função de barreira em um modelo *in vitro* (241).

Dessa forma, os minerais podem modular a composição da microbiota intestinal, contribuir para função da barreira intestinal e inflamação metabólica. Similarmente, as vitaminas e minerais advindos da dieta podem ser biotransformadas pela microbiota intestinal (237). O Zn pode interferir na composição da microbiota intestinal em níveis de filo, gênero e espécie (237,242). A suplementação de Zn foi associada a maior abundância dos filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria e menor abundância do filo Firmicutes. Em nível de

gênero, é descrita uma menor proporção de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, maior abundância de *Akkermansia*, *Blautia* e outras alterações entre as comunidades bacterianas (237,242,243). Vitaminas e metais dietéticos são essenciais para as comunidades bacterianas e para o hospedeiro devido ao seu envolvimento em diversos processos fisiológicos (22,244). Em um estudo prévio, a deficiência de zinco foi associada a supressão de algumas espécies bacterianas que, por sua vez, resultou em diminuição da síntese de AGCC (245). Em contrapartida, em um estudo em camundongos foi demonstrado que o excesso de Zn pode promover a suscetibilidade do *C. difficile* e menor diversidade microbiana (246).

Em relação ao SNC, o Zn possui um papel neuromodulador devido ao seu envolvimento na regulação da proliferação celular, neurogênese, migração neuronal e modulação sináptica. Entretanto os mecanismos de ação responsáveis por estes processos ainda não está muito bem elucidado e fundamentado (247–249). Este micronutriente exerce um papel importante na plasticidade sináptica e em funções relacionadas à aprendizagem e memória. Além disso, é cofator essencial de uma enzima extracelular conhecida como metaloproteinase de matriz (MMP) que está envolvida no processo de maturação do proBDNF em BDNF maduro. Embora os mecanismos não estejam totalmente elucidados, parece que o zinco implica na modulação da sinalização neurotrófica (250–252). Estudos publicados em roedores relataram que a suplementação de zinco foi capaz de aumentar a expressão de BDNF no hipocampo e prevenir o comprometimento cognitivo. Além disso, parece que a eficácia da suplementação de Zn no aumento do BDNF em camundongos obesos foi dose-dependente (253,254). Outro estudo demonstrou que a suplementação de baixas doses de Zn em camundongos obesos exerceu efeitos protetores sobre a expressão de sinaptofisina (254). No estudo prévio realizado em nosso laboratório utilizando os mesmos animais do presente estudo, foi observado um efeito benéfico da suplementação de Zn no sistema nervoso central. A suplementação de Zn foi capaz de diminuir a neuroinflamação evidenciada pela redução da expressão de TLR-4 no hipocampo e ativação microglial no córtex cerebral (30). Todavia, o desequilíbrio de Zn afeta diversos aspectos da fisiologia

no SNC. Enquanto uma deficiência de zinco leva a distúrbios neurodegenerativos e de declínio cognitivo, um excesso desse mineral pode induzir neurotoxicidade (249).

A distribuição de Zn no organismo pode ser afetada pela obesidade (255–257). Alguns aspectos comumente relacionados à obesidade, como alterações nas funções endócrina, metabólica, estresse oxidativo e inflamação, estão relacionadas com o metabolismo e distribuição de zinco nos compartimentos celulares (256). É sugerido que as alterações observadas na obesidade afetam a distribuição deste mineral em indivíduos obesos. A presença de inflamação crônica induz um aumento da expressão de transportadores de Zn que, por sua vez, promovem a absorção deste metal pelos adipócitos. Desse modo, reduz de forma importante sua disponibilidade sistêmica (256,257). Igualmente, a presença de dióxido de titânio (TiO₂), utilizado como um aditivo alimentares em produtos ultraprocessados parece afetar o transporte de Zn em modelo *in vitro* com células epiteliais do cólon (258).

Contudo, embora vários estudos demonstrem efeitos benéficos do Zn em parâmetros metabólicos, não foi estabelecido se este mineral é capaz reverter o estado inflamatório provocado pela indução de obesidade a partir do consumo da CAF em ratos. Ainda, o impacto da sua suplementação sobre aspectos relacionados a integridade da barreira, composição da microbiota intestinal não está muito bem elucidado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da suplementação de zinco sobre a microbiota intestinal, perfil de ácidos graxos e marcadores neurofuncionais em ratos *Wistar* obesos.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Avaliar a morfologia do cólon intestinal;
- 2) Caracterizar e diferenciar a microbiota intestinal de animais submetidos à dieta controle e de cafeteria, associados ou não à suplementação de zinco;
- 3) Caracterizar o perfil de ácidos graxos dos animais submetidos à dieta controle e de cafeteria, associados ou não à suplementação de zinco;
- 4) Avaliar a expressão das proteínas ZO-1 e claudina-5 no intestino, como parâmetros de integridade da barreira intestinal;
- 5) Determinar a expressão das proteínas ZO-1 e claudina-5 no córtex cerebral e hipocampo como marcadores de integridade da barreira hematoencefálica;
- 6) Avaliar a expressão de sinaptofisina e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no córtex cerebral e hipocampo, como marcadores de neuroplasticidade.

3 REFERÊNCIAS

1. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol* 15, 288–298 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>.
2. FAO, IFAD, UNICEF, WFP, WHO. Food Security and Nutrition in the World the State of Building Climate Resilience for Food Security and Nutrition. 2018.
3. World Obesity Federation. Obesity Atlas 2022. Available at: <https://www.worldobesity.org/resources/resource-library/world-obesity-atlas-2022%0Ahttps://data.worldobesity.org/publications/?cat=15#JO>.
4. Ministério da Saúde. Vigitel Brasil 2021 : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico : estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados. Brasília; 2022.
5. Bray GA, Kim KK, Wilding JPH. Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation. *Obes Rev*. 2017;18(7):715–23.
6. WHO. Fact Sheets of Obesity and Overweight. 2020. Available at: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
7. Obradovic M, Sudar-Milovanovic E, Soskic S, Essack M, Arya S, Stewart AJ, et al. Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 May18;12:585887. doi: 10.3389/fendo.2021.585887.
8. Jiang J, Cai X, Pan Y, Du X, Zhu H, Yang X, et al. Relationship of obesity to adipose tissue insulin resistance. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2020 Apr;8(1):e000741. doi: 10.1136/bmjdr-2019-000741.
9. Galgani JE, Cortés V, Carrasco F (2015). Carbohydrate, Fat and Protein Metabolism in Obesity. *Metabolic Syndrome*. Springer, Cham.
10. Taianah Almeida Barroso, Lucas Braga Marins, Renata Alves, Ana Caroline Souza Gonçalves, Sérgio Girão Barroso G de SR. Associação Entre a Obesidade Central e a Incidência de Doenças e Fatores de Risco Cardiovascular. *Int J Cardiovasc Sci*. 2017;30(5):416–24.
11. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*. 2018 Feb;14(2):88–98. doi: 10.1038/nrendo.2017.151.
12. Poly TN, Islam MM, Yang HC, Lin MC, Jian WS, Hsu MH, et al. Obesity and Mortality Among Patients Diagnosed With COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Med*. 2021 February 8:1–11.
13. Willett W, Rockström J, Loken B, Springmann M, Lang T, Vermeulen S, et al. Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *Lancet*. 2019;393(10170):447–92.
14. Bailén M, Bressa C, Martínez-López S, González-Soltero R, Montalvo Lominchar MG, San Juan C, et al. Microbiota Features Associated With a

- High-Fat/Low-Fiber Diet in Healthy Adults. *Front Nutr.* 2020 December 18; 7:583608. doi: 10.3389/fnut.2020.583608.
15. Hsu TM, Kanoski SE. Blood-brain barrier disruption: Mechanistic links between western diet consumption and dementia. *Front Aging Neurosci.* 2014 May 9;6:88. doi: 10.3389/fnagi.2014.00088.
 16. Martinez KB, Leone V, Chang EB. Western diets, gut dysbiosis, and metabolic diseases: Are they linked? *Gut Microbes.* 2017;8(2):130–42. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/19490976.2016.1270811>.
 17. López-Taboada I, González-Pardo H, Conejo NM. Western Diet: Implications for Brain Function and Behavior. *Front Psychol.* 2020; Nov 23;11:564413. doi: 10.3389/fpsyg.2020.564413.
 18. Rinninella E, Cintoni M, Raoul P, Lopetuso LR, Scaldaferri F, Pulcini G, et al. Food components and dietary habits: Keys for a healthy gut microbiota composition. *Nutrients.* 2019 Oct 7;11(10):2393. doi: 10.3390/nu11102393.
 19. Klingbeil E, de La Serre CB. Microbiota modulation by eating patterns and diet composition: Impact on food intake. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2018 Dec 1;315(6):R1254-R1260. doi: 10.1152/ajpregu.00037.2018.
 20. Bortolin RC, Vargas AR, Gasparotto J, Chaves PR, Schnorr CE, Martinello KB, et al. A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: Comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. *Int J Obes (Lond).* 2018 Mar;42(3):525-534. doi: 10.1038/ijo.2017.225.
 21. Zinöcker MK, Lindseth IA. The western diet–microbiome–host interaction and its role in metabolic disease. *Nutrients.* 2018 Mar 17;10(3):365. doi: 10.3390/nu10030365.
 22. Gentile CL, Weir TL. The gut microbiota at the intersection of diet and human health. *Science* 2018 Nov 16;362(6416):776-780. doi: 10.1126/science.aau5812.
 23. Sclafani, A, Springer, D. Dietary Obesity in Adult Rats: Similarities to Hypothalamic and Human Obesity Syndromes. *Physiology&Behavior.* 1976 Sep;17(3):461-71. doi: 10.1016/0031-9384(76)90109-8.
 24. Gil-Cardoso K, Ginés I, Pinent M, Ardévol A, Terra X, Blay M. A cafeteria diet triggers intestinal inflammation and oxidative stress in obese rats. *Br J Nutr.* 2017 Jan;117(2):218-229. doi: 10.1017/S0007114516004608.
 25. Kenny PJ. Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction. *Nat Rev Neurosci.* 2011 Oct 20;12(11):638-51. doi: 10.1038/nrn3105.
 26. South T, Westbrook F, Morris MJ. Neurological and stress related effects of shifting obese rats from a palatable diet to chow and lean rats from chow to a palatable diet. *Physiol Behav.* 2012;105(4):1052–7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.11.019>.

27. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freemerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: Comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)*. 2011 Jun;19(6):1109-17. doi: 10.1038/oby.2011.18.
28. Buyukdere Y, Gulec A, Akyol A. Cafeteria diet increased adiposity in comparison to high fat diet in young male rats. *PeerJ*. 2019 Apr 5;7:e6656. doi: 10.7717/peerj.6656.
29. Gual-Grau A, Guirro M, Mayneris-Perxachs J, Arola L, Boqué N. Impact of different hypercaloric diets on obesity features in rats: a metagenomics and metabolomics integrative approach. *J Nutr Biochem*. 2019 Sep;71:122–31. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.06.005.
30. de Oliveira S, Feijó G dos S, Neto J, Jantsch J, Braga MF, Castro LF dos S, et al. Zinc Supplementation Decreases Obesity-Related Neuroinflammation and Improves Metabolic Function and Memory in Rats. *Obesity (Silver Spring)*. 2021 Jan;29(1):116-124. doi: 10.1002/oby.23024.
31. Pérez-Pérez A, Sánchez-Jiménez F, Vilariño-García T, Sánchez-Margalet V. Role of leptin in inflammation and vice versa. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 16;21(16):5887. doi: 10.3390/ijms21165887.
32. Russo S, Kwiatkowski M, Govorukhina N, Bischoff R, Melgert BN. Meta-Inflammation and Metabolic Reprogramming of Macrophages in Diabetes and Obesity: The Importance of Metabolites. *Front Immunol*. 2021 Nov 5;12:746151. doi: 10.3389/fimmu.2021.746151.
33. Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature*. 2017 Feb 8;542(7640):177-185. doi: 10.1038/nature21363.
34. Chawla A, Nguyen KD, Goh YPS. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011 Oct 10;11(11):738-49. doi: 10.1038/nri3071.
35. Cypess AM. Reassessing Human Adipose Tissue. *N Engl J Med*. 2022 Feb 24;386(8):768-779. doi: 10.1056/NEJMra2032804.
36. Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*. 2020 Mar 19;180(6):1044-1066. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.041.
37. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors : critical proteins © 2001 Nature Publishing Group <http://immunol.nature.com>. 2001 Aug;2(8):675-80. doi: 10.1038/90609.
38. Guerville M, Leroy A, Siquin A, Laugerette F, Michalski MC, Boudry G. Western-diet consumption induces alteration of barrier function mechanisms in the ileum that correlates with metabolic endotoxemia in rats. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2017 Aug 1;313(2):E107-E120. doi: 10.1152/ajpendo.00372.2016.
39. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. 2007 Jul;56(7):1761-

72. doi: 10.2337/db06-1491.
40. Rogero MM, Calder PC. Obesity, inflammation, toll-like receptor 4 and fatty acids. *Nutrients*. 2018 Mar 30;10(4):432. doi: 10.3390/nu10040432.
 41. Cândido TLN, Bressan J, Alfenas R de CG. Dysbiosis and metabolic endotoxemia induced by high-fat diet. *Nutr Hosp*. 2018 Dec 3;35(6):1432-1440. doi: 10.20960/nh.1792.
 42. Davis JE, Gabler NK, Walker-Daniels J, Spurlock ME. Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 Jun;16(6):1248-55. doi: 10.1038/oby.2008.210.
 43. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: Implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci*. 2009 Jan 14;29(2):359-70. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2760-08.2009.
 44. Rocha DM, Caldas AP, Oliveira LL, Bressan J, Hermsdorff HH. Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. *Atherosclerosis*. 2016 Jan;244:211-5. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.11.015.
 45. Malesza IJ, Malesza M, Walkowiak J, Mussin N, Walkowiak D. High-Fat, Western-Style Diet, Systemic Inflammation, and Gut Microbiota : A Narrative Review. *Cells* 2021;10,3164. <https://doi.org/10.3390/cells10113164>.
 46. Wong SW, Kwon MJ, Choi AMK, Kim HP, Nakahira K, Hwang DH. Fatty acids modulate toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. *J Biol Chem*. 2009 Oct 2;284(40):27384-92. doi: 10.1074/jbc.M109.044065.
 47. Stawarska A, Czerwonka M, Wyrębiak R, Wrzesień R, Bobrowska-Korczak B. Zinc affects cholesterol oxidation products and fatty acids composition in rats' serum. *Nutrients*. 2021 May 6;13(5):1563. doi: 10.3390/nu13051563.
 48. Marques CG, dos Santos Quaresma MVL, Nakamoto FP, Magalhães ACO, Lucin GA, Thomatieli-Santos RV. Does Modern Lifestyle Favor Neuroimmunometabolic Changes? A Path to Obesity. *Front Nutr*. 2021 Sep 21;8:705545. doi: 10.3389/fnut.2021.705545.
 49. Azam S, Jakaria M, Kim IS, Kim J, Ezazul Haque M, Choi DK. Regulation of toll-like receptor (TLR) signaling pathway by polyphenols in the treatment of age-linked neurodegenerative diseases: Focus on TLR4 signaling. *Front Immunol*. 2019 May 10;10:1000. doi: 10.3389/fimmu.2019.01000.
 50. Amor S, Puentes F, Baker D, Van Der Valk P. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*. 2010 Feb;129(2):154-69. doi: 10.1111/j.
 51. Robb JL, Morrissey NA, Weightman Potter PG, Smithers HE, Beall C, Ellacott KLJ. Immunometabolic Changes in Glia – A Potential Role in the

- Pathophysiology of Obesity and Diabetes. *Neuroscience*. 2020 Nov 1;447:167-181. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.10.021.
52. Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener*. 2020 Nov 26;9(1):42. doi: 10.1186/s40035-020-00221-2.
 53. Stephenson J, Nutma E, van der Valk P, Amor S. Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. *Immunology*. 2018 Jun;154(2):204-219. doi: 10.1111/imm.12922.
 54. Refolo V, Stefanova N. Neuroinflammation and glial phenotypic changes in alpha-synucleinopathies. *Front Cell Neurosci*. 2019 Jun 13;13:263. doi: 10.3389/fncel.2019.00263.
 55. de Fraga LS, Tassinari ID, Jantsch J, Guedes RP, Bambini-Junior V. 'A picture is worth a thousand words': The use of microscopy for imaging neuroinflammation. *Clin Exp Immunol*. 2021;206(3):325–45. Available at: <https://doi.org/10.1111/cei.13669>.
 56. O'Brien PD, Hinder LM, Callaghan BC, Feldman EL. Neurological consequences of obesity. *Lancet Neurol*. 2017 Jun;16(6):465-477. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30084-4.
 57. Friedman NP, Robbins TW. The role of prefrontal cortex in cognitive control and executive function. *Neuropsychopharmacology*. 2022 Jan;47(1):72-89. doi: 10.1038/s41386-021-01132-0.
 58. Lowe CJ, Reichelt AC, Hall PA. The Prefrontal Cortex and Obesity: A Health Neuroscience Perspective. *Trends Cogn Sci*. April 2019, Vol. 23, No. 4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tics.2019.01.005>
 59. Guillemot-Legris O, Muccioli GG. Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus. *Trends Neurosci*. 2017 Apr;40(4):237-253. doi: 10.1016/j.tins.2017.02.005.
 60. Thaler JP, Guyenet SJ, Dorfman MD, Wisse BE, Schwartz MW. Hypothalamic inflammation: Marker or mechanism of obesity pathogenesis? *Diabetes*. 2013 Aug;62(8):2629-34. doi: 10.2337/db12-1605.
 61. Bruce KD, Zsombok A, Eckel RH. Lipid processing in the brain: A key regulator of systemic metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017 Apr 4;8:60. doi: 10.3389/fendo.2017.00060.
 62. Spencer SJ, Korosi A, Layé S, Shukitt-Hale B, Barrientos RM. Food for thought: how nutrition impacts cognition and emotion. *npj Sci Food*. 2017 Dec 6;1:7. doi: 10.1038/s41538-017-0008-y.
 63. Maric T, Woodside B, Luheshi GN. The effects of dietary saturated fat on basal hypothalamic neuroinflammation in rats. *Brain Behav Immun*. 2014;36:35–45. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2013.09.011>.
 64. Taïb B, Bouyakdan K, Hryhorczuk C, Rodaros D, Fulton S, Alquier T. Glucose regulates hypothalamic long-chain fatty acid metabolism via AMP-activated

- kinase (AMPK) in neurons and astrocytes. *J Biol Chem*. 2013 Dec 27;288(52):37216-29. doi: 10.1074/jbc.M113.506238.
65. Le Foll C, Dunn-Meynell AA, Miziorko HM, Levin BE. Regulation of hypothalamic neuronal sensing and food intake by ketone bodies and fatty acids. *Diabetes*. 2014 Apr;63(4):1259-69. doi: 10.2337/db13-1090.
 66. Le Foll C, Dunn-Meynell AA, Miziorko HM, Levin BE. Role of VMH ketone bodies in adjusting caloric intake to increased dietary fat content in DIO and DR rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2015 May 15;308(10):R872-8. doi: 10.1152/ajpregu.00015.2015.
 67. Thaler JP, Schwartz MW. Minireview: Inflammation and obesity pathogenesis: The hypothalamus heats up. *Endocrinology*. 2010 Sep;151(9):4109-15. doi: 10.1210/en.2010-0336.
 68. Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, et al. Erratum: Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans *J Clin Invest*. 2012 Jan;122(1):153-62. doi: 10.1172/JCI59660. Epub 2011 Dec 27. Erratum in: *J Clin Invest*. 2012 Feb 1;122(2):778.
 69. Eichenbaum H. A cortical–hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci*. 2000 Oct;1(1):41-50. doi: 10.1038/35036213.
 70. Leigh SJ, Morris MJ. Diet, inflammation and the gut microbiome: Mechanisms for obesity-associated cognitive impairment. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2020 Jun 1;1866(6):165767. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165767.
 71. Beilharz JE, Maniam J, Morris MJ. Short-term exposure to a diet high in fat and sugar, or liquid sugar, selectively impairs hippocampal-dependent memory, with differential impacts on inflammation. *Behav Brain Res*. 2016 Jun 1;306:1-7. doi: 10.1016/j.bbr.2016.03.018.
 72. Wang Z, Ge Q, Wu Y, Zhang J, Gu Q, Han J. Impairment of Long-term Memory by a Short-term High-fat Diet via Hippocampal Oxidative Stress and Alterations in Synaptic Plasticity. *Neuroscience*. 2020 Jan 1;424:24-33. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.10.050.
 73. Attuquayefio T, Stevenson RJ, Oaten MJ, Francis HM. A four-day Western-style dietary intervention causes reductions in hippocampal-dependent learning and memory and interoceptive sensitivity. *PLoS One*. 2017 Feb 23;12(2):e0172645. doi: 10.1371/journal.pone.0172645.
 74. de Paula GC, Brunetta HS, Engel DF, Gaspar JM, Velloso LA, Engblom D, et al. Hippocampal Function Is Impaired by a Short-Term High-Fat Diet in Mice: Increased Blood–Brain Barrier Permeability and Neuroinflammation as Triggering Events. *Front Neurosci*. 2021 November 15;1–12. doi: 10.3389/fnins.2021.734158.
 75. Khazen T, Hatoum OA, Ferreira G, Maroun M. Acute exposure to a high-fat diet in juvenile male rats disrupts hippocampal-dependent memory and plasticity through glucocorticoids. *Sci Rep* 9, 12270 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48800-2>.

76. Cai M, Wang H, Li J jing, Zhang YL, Xin L, Li F, et al. The signaling mechanisms of hippocampal endoplasmic reticulum stress affecting neuronal plasticity-related protein levels in high fat diet-induced obese rats and the regulation of aerobic exercise. *Brain Behav Immun.* 2016 Oct;57:347-359. doi: 10.1016/j.bbi.2016.05.010.
77. Travaglia A, La Mendola D. Zinc Interactions With Brain-Derived Neurotrophic Factor and Related Peptide Fragments. 1^o ed. Vol. 104, *Vitamins and Hormones*. Elsevier Inc.; 2017. 29–56 p. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.vh.2016.10.005>.
78. Park H, Poo MM. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci.* 2013 Jan;14(1):7-23. doi: 10.1038/nrn3379.
79. Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F. Synaptophysin: Leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *BioEssays.* 2004 Apr;26(4):445-53. doi: 10.1002/bies.20012.
80. Arthur CP, Stowell MHB. Structure of synaptophysin: A hexameric MARVEL domain channel protein. *Structure.* 2007 Jun;15(6):707-14. doi: 10.1016/j.str.2007.04.011.
81. White DN, Stowell MHB. Room for Two: The Synaptophysin/Synaptobrevin Complex. *Front Synaptic Neurosci.* 2021 Sep 20;13:740318. doi: 10.3389/fnsyn.2021.740318.
82. Baumgarner KM, Setti S, Diaz C, Littlefield A, Jones, Amanda and Kohman RA. Diet-induced obesity attenuates cytokine production following an immune challenge. *Behav Brain Res.* 2014 Jul 1;267:33-41. doi: 10.1016/j.bbr.2014.03.017.
83. Hao S, Dey A, Yua X, Stranahan AM. Dietary obesity reversibly induces synaptic stripping by microglia and impairs hippocampal plasticity. *Brain Behav Immun.* 2016 Jan;51:230-239. doi: 10.1016/j.bbi.2015.08.023.
84. Martinelli I, Tomassoni D, Roy P, Amenta F, Tayebati SK. Altered brain cholinergic and synaptic markers in obese Zucker rats. *Cells.* 2021 Sep 24;10(10):2528. doi: 10.3390/cells10102528.
85. Alonso-Caraballo Y, Hodgson KJ, S.A. Morganc CRF, Vollbrecht PJ. Enhanced anxiety-like behavior emerges with weight gain in male and female obesity-susceptible rats. *Behav Brain Res.* 2019 Mar 15;360:81-93. doi: 10.1016/j.bbr.2018.12.002.
86. Leite F, Ribeiro L. Dopaminergic Pathways in Obesity-Associated Inflammation. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2020 Mar;15(1):93-113. doi: 10.1007/s11481-019-09863-0.
87. Neto J, Jantsch J, De Oliveira S, Braga MF, De Castro LFDS, Diniz BF, et al. DHA/EPA Supplementation Decreases Anxiety-Like Behaviour, but It Does Not Ameliorate Metabolic Profile in Obese Male Rats. *Br J Nutr.* 2021 Oct 4:1-11. doi: 10.1017/S0007114521003998.

88. Dragano NRV, Haddad-Tovolli R, Velloso LA. Leptin, Neuroinflammation and Obesity. *Front Horm Res.* 2017;48:84-96. doi: 10.1159/000452908.
89. Lasselin J, Magne E, Beau C, Aubert A, Dexpert S, Carrez J, et al. Low-grade inflammation is a major contributor of impaired attentional set shifting in obese subjects. *Brain Behav Immun.* 2016 Nov;58:63-68. doi: 10.1016/j.bbi.2016.05.013.
90. Haq RA, Schlachetzki JCM, Glass CK, Mazmanian SK. Microbiome – microglia connections via the gut – brain axis. 2019 Jan 7;216(1):41-59. doi: 10.1084/jem.20180794.
91. Fung TC, Olson CA, Hsiao EY. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat Neurosci.* 2017 Feb;20(2):145-155. doi: 10.1038/nn.4476.
92. Mayer EA, Tillisch K, Gupta A. Gut/brain axis and the microbiota. *J Clin Invest.* 2015 Mar 2;125(3):926-38. doi: 10.1172/JCI76304.
93. Hill-Burns EM, Debelius JW, Morton JT, William TW, Lewis MR, Wallen ZD, et al. Parkinson's Disease and PD Medications Have Distinct Signatures of the Gut Microbiome. *Mov Disord.* 2017 May;32(5):739-749. doi: 10.1002/mds.26942.
94. Li Q, Han Y, Dy ABC, Hagerman RJ. The gut microbiota and autism spectrum disorders. *Front Cell Neurosci.* 2017 Apr 28;11:120. doi: 10.3389/fncel.2017.00120.
95. Wu W, Adame MD, Liou C, Barlow JT, Lai T, Schretter CE, et al. Microbiota regulate social behaviour via stress response neurons in the brain. *Nature.* 2021 Jul;595(7867):409-414. doi: 10.1038/s41586-021-03669-y.
96. Zihni C, Mills C, Matter K, Balda MS. Tight junctions: From simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016 Sep;17(9):564-80. doi: 10.1038/nrm.2016.80.
97. Ren J, Yang M, Wang P, Jiang J, Yan G. Specific role of the tight junction proteins occludin and claudin-5 on the blood-brain barrier during *Listeria monocytogenes* infection. *Med Weter.* 2020;76(6):320–5. doi: dx.doi.org/10.21521/mw.641.
98. Rohr MW, Narasimhulu CA, Rudeski-Rohr TA, Parthasarathy S. Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. *Adv Nutr.* 2020 Jan 1;11(1):77-91. doi: 10.1093/advances/nmz061.
99. Markov AG, Aschenbach JR, Amasheh S. Claudin clusters as determinants of epithelial barrier function. *IUBMB Life.* 2015 Jan;67(1):29-35. doi: 10.1002/iub.1347.
100. Lochhead JJ, Yang J, Ronaldson PT, Davis TP. Structure, Function, and Regulation of the Blood-Brain Barrier Tight Junction in Central Nervous System Disorders. *Front Physiol.* 2020 Aug 6;11:914. doi: 10.3389/fphys.2020.00914.

101. Garcia-Hernandez V, Quiros M, Nusrat A. Intestinal epithelial claudins: Expression and regulation in homeostasis and inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2017 Jun;1397(1):66-79. doi: 10.1111/nyas.13360.
102. Barmeyer C, Fromm M, Schulzke JD. Active and passive involvement of claudins in the pathophysiology of intestinal inflammatory diseases. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2017 Jan;469(1):15-26. doi: 10.1007/s00424-016-1914-6.
103. Lu Z, Ding L, Lu Q, Chen Y-H. Claudins in intestines. *Tissue Barriers.* 2013 Jul 1;1(3):e24978. doi: 10.4161/tisb.24978.
104. Holmes JL, Van Itallie CM, Rasmussen JE, Anderson JM. Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expr Patterns.* 2006 Aug;6(6):581-8. doi: 10.1016/j.modgep.2005.12.001.
105. Rahner C, Mitic LL, Anderson JM. Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology.* 2001 Feb;120(2):411-22. doi: 10.1053/gast.2001.21736.
106. Greene C, Hanley N, Campbell M. Claudin-5: Gatekeeper of neurological function. *Fluids Barriers CNS* 16, 3 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12987-019-0123-z>.
107. Suzuki T. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. *Anim Sci J.* 2020 Jan-Dec;91(1):e13357. doi: 10.1111/asj.13357.
108. Do MH, Lee E, Oh MJ, Kim Y, Park HY. High-glucose or-fructose diet cause changes of the gut microbiota and metabolic disorders in mice without body weight change. *Nutrients.* 2018 Jun 13;10(6):761. doi: 10.3390/nu10060761.
109. Snelson M, Tan SM, Clarke RE, De Pasquale C, Thallas-Bonke V, Nguyen TV, et al. Processed foods drive intestinal barrier permeability and microvascular diseases. *Sci Adv.* 2021 Mar 31;7(14):eabe4841. doi: 10.1126/sciadv.abe4841.
110. Moreira APB, Texeira TFS, Ferreira AB, Do Carmo Gouveia Peluzio M, De Cássia Gonçalves Alfenas R. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br J Nutr.* 2012 Sep;108(5):801-9. doi: 10.1017/S0007114512001213.
111. Ghoshal S, Witta J, Zhong J, de Villiers W, Eckhardt E. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J Lipid Res.* 2009 Jan;50(1):90-7. doi: 10.1194/jlr.M800156-JLR200.
112. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Neyrinck AM, Delzenne NM. Changes in gut microbiota control metabolic diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes.* 2008 Jun;57(6):1470-81. doi: 10.2337/db07-1403.
113. Poritz LS, Garver KI, Green C, Fitzpatrick L, Ruggiero F, Koltun WA. Loss of the Tight Junction Protein ZO-1 in Dextran Sulfate Sodium Induced Colitis. *J Surg Res.* 2007 Jun 1;140(1):12-9. doi: 10.1016/j.jss.2006.07.050.
114. Yong Ji YS, Tso P. Nutrient-induced inflammation in the intestine. *Curr Opin*

- Clin Nutr Metab Care. 2011 Jul;14(4):315-21. doi: 10.1097/MCO.0b013e3283476e74.
115. Overgaard CE, Daugherty BL, Mitchell LA, Koval M. Claudins: Control of barrier function and regulation in response to oxidant stress. *Antioxidants Redox Signal*. 2011;15(5):1179-1193. doi:10.1089/ars.2011.3893.
 116. Liu CY, Yang Y, Ju WN, Wang X, Zhang HL. Emerging roles of astrocytes in neuro-vascular unit and the tripartite synapse with emphasis on reactive gliosis in the context of alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci*. 2018 Jul 10;12:193. doi: 10.3389/fncel.2018.00193.
 117. Galea I. The blood–brain barrier in systemic infection and inflammation. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(11):2489–501. doi: 10.1038/s41423-021-00757-x.
 118. Fisher D, Mentor S. Are claudin-5 tight-junction proteins in the blood-brain barrier porous? *Neural Regen Res*. 2020 Oct;15(10):1838-1839. doi: 10.4103/1673-5374.280308.
 119. Rhea EM, Salameh TS, Logsdon AF, Hanson AJ, Erickson MA, Banks WA. Blood-Brain Barriers in Obesity. *AAPS J*. 2017 Jul;19(4):921-930. doi: 10.1208/s12248-017-0079-3.
 120. Van Dyken P, Lacoste B. Impact of Metabolic Syndrome on Neuroinflammation and the Blood–Brain Barrier. *Front Neurosci*. 2018 Dec 11;12:930. doi: 10.3389/fnins.2018.00930.
 121. Daly DM, Park SJ, Valinsky WC, Beyak MJ. Impaired intestinal afferent nerve satiety signalling and vagal afferent excitability in diet induced obesity in the mouse. *J Physiol*. 2011 Jun 1;589(Pt 11):2857-70. doi: 10.1113/jphysiol.2010.204594.
 122. de Lartigue G, de La Serre CB, Raybould HE. Vagal afferent neurons in high fat diet-induced obesity; intestinal microflora, gut inflammation and cholecystokinin. *Physiol Behav*. 2011 Nov 30;105(1):100-5. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.02.040.
 123. Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaïss CA, Elinav E. Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2017 Apr;17(4):219-232. doi: 10.1038/nri.2017.7.
 124. Paiva IHR, Duarte-Silva E, Peixoto CA. The role of prebiotics in cognition, anxiety, and depression. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2020 May;34:1-18. doi: 10.1016/j.euroneuro.2020.03.006.
 125. Shi FD. Neuroinflammation. *Neurosci Bull*. 2015;31(6):714-716. doi:10.1007/s12264-015-1568-y.
 126. Alexaki VI. The impact of obesity on microglial function: Immune, metabolic and endocrine perspectives. *Cells*. 2021 Jun 23;10(7):1584. doi: 10.3390/cells10071584.
 127. Segú H, Jalševac F, Pinent M, Ardévol A, Blay XT and MT. Intestinal Morphometric Changes Induced by a Western-Style Diet in Wistar Rats and GSPE Counter-Regulatory Effect. *Nutrients*. 2022;14(13):2608. Published

2022 Jun 23. doi:10.3390/nu14132608.

128. Requena T, Martínez-Cuesta MC, Peláez C. Diet and microbiota linked in health and disease. *Food Funct.* 2018 Feb 21;9(2):688-704. doi: 10.1039/c7fo01820g.
129. Seyyedineh S, Nazem MN. Histomorphometric study of the effect of methionine on small intestine parameters in rat: An applied histologic study. *Folia Morphol.* 2017;76(4):620-629. doi: 10.5603/FM.a2017.0044.
130. Dailey MJ. Nutrient-induced intestinal adaption and its effect in obesity. *Physiol Behav.* 2014 Sep;136:74-8. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.03.026.
131. Dominguez-Bello MG, Godoy-Vitorino F, Knight R, Blaser MJ. Role of the microbiome in human development. *Gut.* 2019 Jun;68(6):1108-1114. doi: 10.1136/gutjnl-2018-317503.
132. Cani PD, Van Hul M, Lefort C, Depommier C, Rastelli M, Everard A. Microbial regulation of organismal energy homeostasis. *Nat Metab.* 2019 Jan;1(1):34-46. doi: 10.1038/s42255-018-0017-4.
133. Thaïss CA, Zmora N, Levy M, Elinav E. The microbiome and innate immunity. *Nature.* 2016 Jul 7;535(7610):65-74. doi: 10.1038/nature18847.
134. Cenit MC, Sanz Y, Codoñer-Franch P. Influence of gut microbiota on neuropsychiatric disorders. *World J Gastroenterol.* 2017 Aug 14;23(30):5486-5498. doi: 10.3748/wjg.v23.i30.5486.
135. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012 Sep 4;9(10):577-89. doi: 10.1038/nrgastro.2012.156.
136. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Paslier D Le, Batto J, Bertalan M, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011 May 12;473(7346):174-80. doi: 10.1038/nature09944.
137. Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489, 242–249 (2012). <https://doi.org/10.1038/nature11552>.
138. Wang J, Tang H, Zhang C, Zhao Y, Derrien M, Rocher E, et al. Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *ISME J.* 2015 Jan;9(1):1-15. doi: 10.1038/ismej.2014.99.
139. Guo P, Zhang K, Ma X, He P. Clostridium species as probiotics: Potentials and challenges. *J Anim Sci Biotechnol.* 2020 Feb 20;11:24. doi: 10.1186/s40104-019-0402-1.
140. Woting A, Pfeiffer N, Loh G, Klaus S, Blaut M. Clostridium ramosum promotes High-Fat diet-induced obesity in Gnotobiotic Mouse Models. *MBio.* 2014 Sep 30;5(5):e01530-14. doi: 10.1128/mBio.01530-14.
141. Nie K, Ma K, Luo W, Shen Z, Yang Z, Xiao M, et al. Roseburia intestinalis: A Beneficial Gut Organism From the Discoveries in Genus and Species. *Front*

- Cell Infect Microbiol. 2021 Nov 22;11:757718. doi: 10.3389/fcimb.2021.757718.
142. Ruan G, Chen M, Chen L, Xu F, Xiao Z, Yi A, et al. Roseburia intestinalis and Its Metabolite Butyrate Inhibit Colitis and Upregulate TLR5 through the SP3 Signaling Pathway. Nutrients. 2022;14,3041. <https://doi.org/10.3390/nu14153041>.
 143. Maioli TU, Borrás-Nogues E, Torres L, Barbosa SC, Martins VD, Langella P, et al. Possible Benefits of Faecalibacterium prausnitzii for Obesity-Associated Gut Disorders. Front Pharmacol. 2021 Dec 2;12:740636. doi: 10.3389/fphar.2021.740636.
 144. Hu W, Gao W, Liu Z, Fang Z, Zhao J, Zhang H, et al. Biodiversity and Physiological Characteristics of Novel Faecalibacterium prausnitzii Strains Isolated from Human Feces. Microorganisms. 2022; 10(2):297. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020297>.
 145. Liu X, Mao B, Gu J, Wu J, Cui S, Wang G, et al. Blautia—a new functional genus with potential probiotic properties? Gut Microbes. 2021 Jan-Dec;13(1):1-21. doi: 10.1080/19490976.2021.1875796.
 146. Ozato N, Saito S, Yamaguchi T, Katashima M, Tokuda I, Sawada K, et al. Blautia genus associated with visceral fat accumulation in adults 20–76 years of age. npj Biofilms Microbiomes 5, 28 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0101-x>.
 147. Ozato N, Yamaguchi T, Mori K, Katashima M, Kumagai M, Murashita K, et al. Two Blautia Species Associated with Visceral Fat Accumulation: A One-Year Longitudinal Study. Biology (Basel). 2022 Feb 16;11(2):318. doi: 10.3390/biology11020318.
 148. Rios-Covian D, Salazar N, Gueimonde M, de los Reyes-Gavilan CG. Shaping the metabolism of intestinal Bacteroides population through diet to improve human health. Front Microbiol. 2017 Mar 7;8:376. doi: 10.3389/fmicb.2017.00376.
 149. Larsen JM. The immune response to Prevotella bacteria in chronic inflammatory disease. Immunology. 2017 Aug;151(4):363-374. doi: 10.1111/imm.12760.
 150. Tett A, Pasolli E, Masetti G, Ercolini D, Segata N. Prevotella diversity, niches and interactions with the human host. Nat Rev Microbiol 19, 585–599 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00559-y>.
 151. Hidalgo-Cantabrana C, Delgado S, Ruiz L, Ruas-Madiedo P, Sánchez B, Margolles A. Bifidobacteria and Their Health-Promoting Effects. Microbiol Spectr. 2017 Jun;5(3). doi: 10.1128/microbiolspec.BAD-0010-2016.
 152. Sharma M, Wasan A, Sharma RK. Recent developments in probiotics: An emphasis on Bifidobacterium. Food Biosci. 2021 January;41:100993. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100993>.

153. Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.* 2015;33(9):496–503. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>.
154. Zhang C, Zhang M, Pang X, Zhao Y, Wang L, Zhao L. Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. *ISME J.* 2012 Oct;6(10):1848-57. doi: 10.1038/ismej.2012.27.
155. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Aug 17;107(33):14691-6. doi: 10.1073/pnas.1005963107.
156. Kushkevych I, Cejnar J, Trembl J, Dordević D, Kollar P, Vítězová M. Recent Advances in Metabolic Pathways of Sulfate Reduction in Intestinal Bacteria. *Cells.* 2020 Mar 12;9(3):698. doi: 10.3390/cells9030698.
157. Chelakkot C, Choi Y, Kim DK, Park HT, Ghim J, Kwon Y, et al. Akkermansia muciniphila-derived extracellular vesicles influence gut permeability through the regulation of tight junctions. *Exp Mol Med.* 2018 Feb 23;50(2):e450. doi: 10.1038/emmm.2017.282.
158. Macchione IG, Lopetuso LR, Ianaro G, Napol M, Gibiino G, Rizzatt G, et al. Akkermansia muciniphila: Key player in metabolic and gastrointestinal disorders. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019 Sep;23(18):8075-8083. doi: 10.26355/eurrev_201909_19024.
159. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 May 28;110(22):9066-71. doi: 10.1073/pnas.1219451110.
160. de Vos WM. Microbe profile: Akkermansia muciniphila: A conserved intestinal symbiont that acts as the gatekeeper of our mucosa. *Microbiology (Reading).* 2017 May;163(5):646-648. doi: 10.1099/mic.0.000444.
161. Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol* 19, 55–71 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9>.
162. Ou Z, Deng L, Lu Z, Wu F, Liu W, Huang D, et al. Protective effects of Akkermansia muciniphila on cognitive deficits and amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nutr Diabetes.* 2020 Apr 22;10(1):12. doi: 10.1038/s41387-020-0115-8.
163. Jamar G, Santamarina AB, Dias GC, Masquio DCL, de Rosso VV, Pisani LP. Relationship between fatty acids intake and Clostridium coccoides in obese individuals with metabolic syndrome. *Food Res Int.* 2018 Nov;113:86-92. doi: 10.1016/j.foodres.2018.07.002.
164. Hooper L V., MacPherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol.* 2010 Mar;10(3):159-69. doi: 10.1038/nri2710.

165. Iebba V, Totino V, Gagliardi A, Santangelo F, Cacciotti F, Trancassini M, et al. Eubiosis and dysbiosis: The two sides of the microbiota. *New Microbiol.* 2016 Jan;39(1):1-12.
166. Zhang YJ, Li S, Gan RY, Zhou T, Xu DP, Li H Bin. Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *Int J Mol Sci.* 2015 Apr 2;16(4):7493-519. doi: 10.3390/ijms16047493.
167. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature.* 2013 Aug 29;500(7464):541-6. doi: 10.1038/nature12506.
168. Davis SC, Yadav JS, Barrow SD, Robertson BK. Gut microbiome diversity influenced more by the Westernized dietary regime than the body mass index as assessed using effect size statistic. *Microbiologyopen.* 2017 Aug;6(4):e00476. doi: 10.1002/mbo3.476.
169. Agustí A, García-Pardo MP, López-Almela I, Campillo I, Maes M, Romaní-Pérez M, et al. Interplay between the gut-brain axis, obesity and cognitive function. *Front Neurosci.* 2018 Mar 16;12:155. doi: 10.3389/fnins.2018.00155.
170. Grasset E, Puel A, Charpentier J, Collet X, Christensen JE, Tercé F, et al. A Specific Gut Microbiota Dysbiosis of Type 2 Diabetic Mice Induces GLP-1 Resistance through an Enteric NO-Dependent and Gut-Brain Axis Mechanism. *Cell Metab.* 2017 May 2;25(5):1075-1090.e5. doi: 10.1016/j.cmet.2017.04.013. Erratum in: *Cell Metab.* 2017 Jul 5;26(1):278.
171. Cryan JF, O'riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu K V., Bastiaanssen TFS, Boehme M, et al. The microbiota-gut-brain axis. *Physiol Rev.* 2019 Oct 1;99(4):1877-2013. doi: 10.1152/physrev.00018.2018.
172. Jonsson AL, Bäckhed F. Role of gut microbiota in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2017 Feb;14(2):79-87. doi: 10.1038/nrcardio.2016.183.
173. Stecher B, Hardt WD. Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Curr Opin Microbiol.* 2011;14(1):82–91. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2010.10.003>
174. Postler TS, Ghosh S. Understanding the Holobiont: How microbial metabolites affect human health and shape the immune system. *Cell Metab.* 2017;110–30.
175. Shi H, Yu Y, Lin D, Zheng P, Zhang P, Hu M, et al. B-Glucan Attenuates Cognitive Impairment Via the Gut-Brain Axis in Diet-Induced Obese Mice. *Microbiome.* 2020 Oct 2;8(1):143. doi: 10.1186/s40168-020-00920-y.
176. Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ.* 2018 Jun 13;361:k2179. doi: 10.1136/bmj.k2179.
177. Scheithauer TPM, Rampanelli E, Nieuwdorp M, Vallance BA, Verchere CB, van Raalte DH, et al. Gut Microbiota as a Trigger for Metabolic Inflammation in Obesity and Type 2 Diabetes. *Front Immunol.* 2020;11:571731. Published 2020 Oct 16. doi:10.3389/fimmu.2020.571731.

178. Scheithauer TPM, Dallinga-Thie GM, de Vos WM, Nieuwdorp M, van Raalte DH. Causality of small and large intestinal microbiota in weight regulation and insulin resistance. *Mol Metab.* 2016 Jun 10;5(9):759-70. doi: 10.1016/j.molmet.2016.06.002.
179. Meijnikman AS, Gerdes VE, Nieuwdorp M, Herrema H. Evaluating causality of gut microbiota in obesity and diabetes in humans. *Endocr Rev.* 2018 Apr 1;39(2):133-153. doi: 10.1210/er.2017-00192.
180. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006 Dec 21;444(7122):1027-31. doi: 10.1038/nature05414.
181. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper L V., Gou YK, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Nov 2;101(44):15718-23. doi: 10.1073/pnas.0407076101.
182. Wang R, Li H, Yang X, Xue X, Deng L, Shen J, et al. Genetically obese human gut microbiota induces liver steatosis in germ-free mice fed on normal diet. *Front Microbiol.* 2018;9:1602. Published 2018 Jul 20. doi:10.3389/fmicb.2018.01602.
183. Trikha SRJ, Lee DM, Ecton KE, Wrigley SD, Vazquez AR, Litwin NS, et al. Transplantation of an obesity-associated human gut microbiota to mice induces vascular dysfunction and glucose intolerance. *Gut Microbes.* 2021 Jan-Dec;13(1):1940791. doi: 10.1080/19490976.2021.1940791.
184. Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jan 16;104(3):979-84. doi: 10.1073/pnas.0605374104.
185. Logan IE, Bobe G, Miranda CL, Vasquez-Perez S, Choi J, Lowry MB, et al. Germ-free swiss webster mice on a high-fat diet develop obesity, hyperglycemia, and dyslipidemia. *Microorganisms.* 2020 Apr 5;8(4):520. doi: 10.3390/microorganisms8040520.
186. Moretti CH, Schiffer TA, Li X, Weitzberg E, Carlström M, Lundberg JO. Germ-free mice are not protected against diet-induced obesity and metabolic dysfunction. *Acta Physiol (Oxf).* 2021;231(3):e13581. doi:10.1111/apha.13581.
187. Torres-Fuentes C, Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. The microbiota–gut–brain axis in obesity. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017 Oct;2(10):747-756. doi: 10.1016/S2468-1253(17)30147-4.
188. Margolis KG, Cryan JF, Mayer EA. The Microbiota-Gut-Brain Axis: From Motility to Mood. *Gastroenterology.* 2021 Apr;160(5):1486-1501. doi: 10.1053/j.gastro.2020.10.066.
189. Grenham S, Clarke G, Cryan JF, Dinan TG. Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Front Physiol.* 2011 Dec 7;2:94. doi: 10.3389/fphys.2011.00094.

190. Browning KN, Travagli RA. Central nervous system control of gastrointestinal motility and secretion and modulation of gastrointestinal functions. *Compr Physiol*. 2014 Oct;4(4):1339-68. doi: 10.1002/cphy.c130055.
191. Foster JA, Rinaman L, Cryan JF. Stress & the gut-brain axis: Regulation by the microbiome. *Neurobiol Stress*. 2017 Mar 19;7:124-136. doi: 10.1016/j.ynstr.2017.03.001.
192. Moloney RD, Desbonnet L, Clarke G, Dinan TG, Cryan JF. The microbiome: Stress, health and disease. *Mamm Genome*. 2014 Feb;25(1-2):49-74. doi: 10.1007/s00335-013-9488-5.
193. Barathikannan K, Chelliah R, Rubab M, Daliri EBM, Elahi F, Kim DH, et al. Gut microbiome modulation based on probiotic application for anti-obesity: A review on efficacy and validation. *Microorganisms*. 2019 Oct 16;7(10):456. doi: 10.3390/microorganisms7100456.
194. Abenavoli L, Scarpellini E, Colica C, Boccuto L, Salehi B, Sharifi-Rad J, et al. Gut microbiota and obesity: A role for probiotics. *Nutrients*. 2019 Nov 7;11(11):2690. doi: 10.3390/nu11112690.
195. Rastelli M, Knauf C, Cani PD. Gut Microbes and Health: A Focus on the Mechanisms Linking Microbes, Obesity, and Related Disorders. *Obesity (Silver Spring)*. 2018 May;26(5):792-800. doi: 10.1002/oby.22175.
196. Janakiraman M, Krishnamoorthy G. Emerging role of diet and microbiota interactions in neuroinflammation. *Front Immunol*. 2018 Sep 11;9:2067. doi: 10.3389/fimmu.2018.02067.
197. Portincasa P, Bonfrate L, Vacca M, De Angelis M, Farella I, Lanza E, et al. Gut Microbiota and Short Chain Fatty Acids: Implications in Glucose Homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3):1105. Published 2022 Jan 20. doi:10.3390/ijms23031105.
198. Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol*. 2017 Jan;19(1):29-41. doi: 10.1111/1462-2920.13589.
199. Rios-Covian D, González S, Nogacka AM, Arboleya S, Salazar N, Gueimonde M, et al. An Overview on Fecal Branched Short-Chain Fatty Acids Along Human Life and as Related With Body Mass Index: Associated Dietary and Anthropometric Factors. *Front Microbiol*. 2020;11:973. Published 2020 May 27. doi:10.3389/fmicb.2020.00973.
200. Pérez-Reytor D, Puebla C, Karahanian E, García K. Use of Short-Chain Fatty Acids for the Recovery of the Intestinal Epithelial Barrier Affected by Bacterial Toxins. *Front Physiol*. 2021 May 24;12:650313. doi: 10.3389/fphys.2021.650313.
201. Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Jan 31;11:25. doi: 10.3389/fendo.2020.00025.

202. Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*. 2016 May 3;7(3):189-200. doi: 10.1080/19490976.2015.1134082.
203. Wyss MT, Magistretti PJ, Buck A, Weber B. Labeled acetate as a marker of astrocytic metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011 Aug;31(8):1668-74. doi: 10.1038/jcbfm.2011.84.
204. Frost G, Sleeth ML, Sahuri-Arisoylu M, Lizarbe B, Cerdan S, Brody L, et al. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun*. 2014 Apr 29;5:3611. doi: 10.1038/ncomms4611.
205. Cani PD. Human gut microbiome: Hopes, threats and promises. *Gut*. 2018 Sep;67(9):1716-1725. doi: 10.1136/gutjnl-2018-316723.
206. Lin H V., Frassetto A, Kowalik EJ, Nawrocki AR, Lu MM, Kosinski JR, et al. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PLoS One*. 2012;7(4):e35240. doi: 10.1371/journal.pone.0035240.
207. Salvi PS, Cowles RA. Butyrate and the intestinal epithelium: Modulation of proliferation and inflammation in homeostasis and disease. *Cells*. 2021 Jul 14;10(7):1775. doi: 10.3390/cells10071775.
208. Jacobse J, Li J, Rings EHHM, Samsom JN, Goettel JA. Intestinal Regulatory T Cells as Specialized Tissue-Restricted Immune Cells in Intestinal Immune Homeostasis and Disease. *Front Immunol*. 2021 Aug 4;12:716499. doi: 10.3389/fimmu.2021.716499.
209. Dockray GJ. Gastrointestinal hormones and the dialogue between gut and brain. *J Physiol*. 2014 Jul 15;592(14):2927-41. doi: 10.1113/jphysiol.2014.270850.
210. Sandhu K V., Sherwin E, Schellekens H, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. Feeding the microbiota-gut-brain axis: diet, microbiome, and neuropsychiatry. *Transl Res*. 2017 Jan;179:223-244. doi: 10.1016/j.trsl.2016.10.002.
211. Macia L, Tan J, Vieira AT, Leach K, Stanley D, Luong S, et al. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nat Commun*. 2015 Apr 1;6:6734. doi: 10.1038/ncomms7734.
212. Markowiak-Kopeć P, Śliżewska K. The effect of probiotics on the production of short-chain fatty acids by human intestinal microbiome. *Nutrients*. 2020 Apr 16;12(4):1107. doi: 10.3390/nu12041107.
213. Singh N, Gurav A, Sivaprakasam S, Brady E, Padia R, Shi H, et al. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity*. 2014 Jan 16;40(1):128-39. doi: 10.1016/j.immuni.2013.12.007.
214. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, Liu H, Cross JR, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T cell

- generation. *Nature*. 2013 Dec 19;504(7480):451-5. doi: 10.1038/nature12726.
215. Aguirre M, Eck A, Koenen ME, Savelkoul PHM, Budding AE, Venema K. Diet drives quick changes in the metabolic activity and composition of human gut microbiota in a validated in vitro gut model. *Res Microbiol*. 2016 Feb-Mar;167(2):114-25. doi: 10.1016/j.resmic.2015.09.006.
 216. Schwartz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity*. 2010 Jan;18(1):190-5. doi: 10.1038/oby.2009.167.
 217. Rahat-Rozenbloom S, Fernandes J, Gloor GB, Wolever TMS. Evidence for greater production of colonic short-chain fatty acids in overweight than lean humans. *Int J Obes (Lond)*. 2014 Dec;38(12):1525-31. doi: 10.1038/ijo.2014.46.
 218. Mangray S, Zweit J, Puri P. Zinc Deficiency in Cirrhosis: Micronutrient for Thought? *Dig Dis Sci*. 2015 Oct;60(10):2868-70. doi: 10.1007/s10620-015-3854-y.
 219. Institute of Medicine F and NBNAP. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. 2001 Mar;101(3):294-301. doi: 10.1016/S0002-8223(01)00078-5.
 220. Mehri A. Trace Elements in Human Nutrition (II) – An Update. *Int J Prev Med*. 2020 Jan 3;11:2. doi: 10.4103/ijpvm.IJPVM_48_19.
 221. Lönnerdal B. Zinc and Health : Current Status and Future Directions Dietary Factors Influencing Zinc Absorption 1. *J Nutr*. 2000 May;130(5S Suppl):1378S-83S. doi: 10.1093/jn/130.5.1378S.
 222. Wessells KR, Brown KH. Estimating the Global Prevalence of Zinc Deficiency: Results Based on Zinc Availability in National Food Supplies and the Prevalence of Stunting. *PLoS ONE* 7(11): e50568. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050568>
 223. Hussain A, Jiang W, Wang X, Shahid S, Saba N, Ahmad M, Dar A, Masood SU, Imran M and Mustafa A (2022) Mechanistic Impact of Zinc Deficiency in Human Development. *Front. Nutr*. 9:717064. doi: 10.3389/fnut.2022.717064
 224. Prasad AS. Discovery of human zinc deficiency: 50 years later. *J Trace Elem Med Biol*. 2012;26(2–3):66–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2012.04.004>
 225. Hara T, Takeda T aki, Takagishi T, Fukue K, Kambe T, Fukada T. Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *J Physiol Sci*. 2017 Mar;67(2):283-301. doi: 10.1007/s12576-017-0521-4.
 226. Kimura T, Kambe T. The functions of metallothionein and ZIP and ZnT transporters: An overview and perspective. *Int J Mol Sci*. 2016 Mar 4;17(3):336. doi: 10.3390/ijms17030336.

227. Fukunaka A, Fujitani Y. Role of zinc homeostasis in the pathogenesis of diabetes and obesity. *Int J Mol Sci.* 2018 Feb 6;19(2):476. doi: 10.3390/ijms19020476.
228. Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, Itsumura N. The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism. *Physiol Rev.* 2015 Jul;95(3):749-84. doi: 10.1152/physrev.00035.2014.
229. Skalny A V., Aschnera M, Tinkov AA. Zinc. *Adv Food Nutr Res.* 2021;96:251-310. doi: 10.1016/bs.afnr.2021.01.003.
230. Chasapis CT, Ntoupa PSA, Spiliopoulou CA, Stefanidou ME. Recent aspects of the effects of zinc on human health. *Arch Toxicol.* 2020 May;94(5):1443-1460. doi: 10.1007/s00204-020-02702-9.
231. Chimienti F, Devergnas S, Pattou F, Schult F, Garcia-Cuenca R, Vandewalle B, et al. In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion. *J Cell Sci.* 2006 Oct 15;119(Pt 20):4199-206. doi: 10.1242/jcs.03164.
232. Cooper-Capetini V, de Vasconcelos DAA, Martins AR, Hirabara SM, Donato J, Carpinelli AR, et al. Zinc supplementation improves glucose homeostasis in high fat-fed mice by enhancing pancreatic β -cell function. *Nutrients.* 2017 Oct 20;9(10):1150. doi: 10.3390/nu9101150.
233. Fathi M, Alavinejad P, Haidari Z, Amani R. The effects of zinc supplementation on metabolic profile and oxidative stress in overweight/obese patients with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Trace Elem Med Biol.* 2020 Dec;62:126635. doi: 10.1016/j.jtemb.2020.126635.
234. Khorsandi H, Nikpayam O, Yousefi R, Parandoosh M, Hosseinzadeh N, Saidpour A, et al. Zinc supplementation improves body weight management, inflammatory biomarkers and insulin resistance in individuals with obesity: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Diabetol Metab Syndr.* 2019 Dec 2;11:101. doi: 10.1186/s13098-019-0497-8.
235. Olechnowicz J, Tinkov A, Skalny A, Suliburska J. Zinc status is associated with inflammation, oxidative stress, lipid, and glucose metabolism. *J Physiol Sci.* 2018 Jan;68(1):19-31. doi: 10.1007/s12576-017-0571-7.
236. Podany A, Rauchut J, Wu T, Kawasaki YI, Wright J, Lamendella R, et al. Excess Dietary Zinc Intake in Neonatal Mice Causes Oxidative Stress and Alters Intestinal Host–Microbe Interactions. *Mol Nutr Food Res.* 2019 Feb;63(3):e1800947. doi: 10.1002/mnfr.201800947.
237. Barra NG, Anhê FF, Cavallari JF, Singh AM, Chan DY, Schertzer JD. Micronutrients impact the gut microbiota and blood glucose. *J Endocrinol.* 2021 Jul 28;250(2):R1-R21. doi: 10.1530/JOE-21-0081.
238. Jarosz M, Olbert M, Wyszogrodzka G, Młyniec K, Librowski T. Antioxidant and anti-inflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF- κ B signaling. *Inflammopharmacology.* 2017 Feb;25(1):11-24. doi: 10.1007/s10787-017-

0309-4.

239. Maret W. The redox biology of redox-inert zinc ions. *Free Radic Biol Med*. 2019 Apr;134:311-326. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.006.
240. Miyoshi Y, Tanabe S, Suzuki T. Cellular zinc is required for intestinal epithelial barrier maintenance via the regulation of claudin-3 and occludin expression. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2016 Jul 1;311(1):G105-16. doi: 10.1152/ajpgi.00405.2015.
241. Mercado J, Valenzano MC, Jeffers C, Sedlak J, Cugliari MK, Papanikolaou E, et al. Enhancement of tight junctional barrier function by micronutrients: Compound-specific effects on permeability and claudin composition. *PLoS One*. 2013 Nov 13;8(11):e78775. doi: 10.1371/journal.pone.0078775.
242. Chen L, Wang Z, Wang P, Yu X, Ding H, Wang Z, et al. Effect of Long-Term and Short-Term Imbalanced Zn Manipulation on Gut Microbiota and Screening for Microbial Markers Sensitive to Zinc Status. *Microbiol Spectr*. 2021;9(3):e0048321. doi:10.1128/Spectrum.00483-21
243. Popovic A, Bourdon C, Wang PW, Guttman DS, Soofi S, Bhutta ZA, et al. Micronutrient supplements can promote disruptive protozoan and fungal communities in the developing infant gut. *Nat Commun*. 2021 Nov 18;12(1):6729. doi: 10.1038/s41467-021-27010-3.
244. Lopez CA, Skaar EP. The impact of dietary transition metals on host-bacterial interactions. *Cell Host Microbe*. 2018 Jun 13;23(6):737-748. doi: 10.1016/j.chom.2018.05.008.
245. Reed S, Neuman H, Moscovich S, Glahn RP, Koren O, Tako E. Chronic zinc deficiency alters chick gut microbiota composition and function. *Nutrients*. 2015 Nov 27;7(12):9768-84. doi: 10.3390/nu7125497.
246. Zackular JP, Moore JL, Ashley T, Jordan, Juttukonda LJ, Noto MJ, Nicholson MR, et al. Dietary Zinc Alters the Microbiota and Decreases Resistance to *Clostridium difficile* Infection. *Nat Med*. 2016 Nov;22(11):1330-1334. doi: 10.1038/nm.4174.
247. Mattei D, Pietrobelli A. Micronutrients and Brain Development. *Curr Nutr Rep*. 2019 Jun;8(2):99-107. doi: 10.1007/s13668-019-0268-z.
248. Frederickson CJ, Koh JY, Bush AI. The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Jun;6(6):449-62. doi: 10.1038/nrn1671.
249. Choi S, Hong DK, Choi BY, Suh SW. Zinc in the brain: Friend or foe? *Int J Mol Sci*. 2020 Nov 25;21(23):8941. doi: 10.3390/ijms21238941.
250. Sensi SL, Granzotto A, Siotto M, Squitti R. Copper and Zinc Dysregulation in Alzheimer's Disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2018 Dec;39(12):1049-1063. doi: 10.1016/j.tips.2018.10.001.
251. Granzotto A, Canzoniero LMT, Sensi SL. A Neurotoxic Ménage-à-trois: Glutamate, Calcium, and Zinc in the Excitotoxic Cascade. *Front Mol Neurosci*. 2020 Nov 26;13:600089. doi: 10.3389/fnmol.2020.600089.

252. Jung JH, Park MH, Choi SY, Koh JY. Activation of the Trk signaling pathway by extracellular zinc. Role of metalloproteinases. *J Biol Chem.* 2005 Mar 25;280(12):11995-2001. doi: 10.1074/jbc.M403172200.
253. Corona C, Masciopinto F, Silvestri E, Viscovo A Del, Lattanzio R, Sorda RL, et al. Dietary zinc supplementation of 3xTg-AD mice increases BDNF levels and prevents cognitive deficits as well as mitochondrial dysfunction. *Cell Death Dis.* 2010 Oct 28;1(10):e91. doi: 10.1038/cddis.2010.73.
254. Nam SM, Kim JW, Kwon HJ, Yoo DY, Jung HY, Kim DW, et al. Differential Effects of Low- and High-dose Zinc Supplementation on Synaptic Plasticity and Neurogenesis in the Hippocampus of Control and High-fat Diet-fed Mice. *Neurochem Res.* 2017 Nov;42(11):3149-3159. doi: 10.1007/s11064-017-2353-2.
255. Rios-Lugo MJ, Madrigal-Arellano C, Gaytán-Hernández D, Hernández-Mendoza H, Romero-Guzmán ET. Association of Serum Zinc Levels in Overweight and Obesity. *Biol Trace Elem Res.* 2020 Nov;198(1):51-57. doi: 10.1007/s12011-020-02060-8.
256. Samad N. Serum levels of leptin, zinc and tryptophan with obesity: A case-control study. *Pak J Pharm Sci.* 2017 Sep;30(5):1691-1696.
257. Gu K, Xiang W, Zhang Y, Sun K, Jiang X. The association between serum zinc level and overweight/obesity: a meta-analysis. *Eur J Nutr.* 2020;11(2):398-411. doi:10.1093/advances/nmz084.
258. Zhongyuan Guo, Nicole J. Martucci, Fabiola Moreno-Olivas, Elad Tako and GJM. Titanium Dioxide Nanoparticle Ingestion Alters Nutrient Absorption in an In Vitro Model of the Small Intestine. *NanoImpact.* 2017 Jan;5:70-82. doi: 10.1016/j.impact.2017.01.002.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

ZINC SUPPLEMENTATION PARTIALLY DECREASES THE HARMFUL EFFECTS OF A CAFETERIA DIET IN RATS BUT DOES NOT PREVENT INTESTINAL DYSBIOSIS

Artigo publicado na revista científica *Nutrients*.

DOI: 10.3390/nu14193921.

Article

Zinc supplementation partially decreases the harmful effects of a cafeteria diet in rats but does not prevent intestinal dysbiosis

Samia Squizani¹, Jeferson Jantsch¹, Fernanda Rodrigues¹, Matheus Filipe Braga⁴, Sarah Eller², Tiago Franco de Oliveira², Alexandre Kleber Silveira⁵, José Cláudio Fonseca Moreira^{1,5}, Marcia Giovenardi^{1,2}, Marilene Porawski^{1,3} and Renata Padilha Guedes^{1,2*}

Citation: Squizani, S.; Jantsch, J.; Rodrigues, F.d.S.; Braga, M.F.; Eller, S.; de Oliveira, T.F.; Silveira, A.K.; Moreira, J.C.F.; Giovenardi, M.; Porawski, M.; et al. Zinc Supplementation Partially Decreases the Harmful Effects of a Cafeteria Diet in Rats but Does Not Prevent Intestinal Dysbiosis. *Nutrients* 2022, 14, 3921. <https://doi.org/10.3390/nu1419392>

Academic Editor: Monica Dinu and Daniela Martini

Received: 29 August 2022 Accepted: 15 September 2022 Published: 22 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

¹ Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil;

² Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil;

³ Programa de Pós-Graduação em Medicina: Hepatologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil.

⁴ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil.

⁵ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

* Correspondence: renata.guedes@ufcspa.edu.br; Tel.: +55 51 3303-8751.

Abstract: Zinc (Zn) plays an important role in metabolic homeostasis and may modulate neurological impairment related to obesity. The present study aimed to evaluate the effect of Zn supplementation on the intestinal microbiota, fatty acid profile, and neurofunctional parameters in obese male Wistar rats. Rats were fed a cafeteria diet (CAF), composed of ultra-processed and highly caloric and palatable foods, for 20 weeks to induce obesity. From week 16th, Zn supplementation was started (10 mg/kg/day). At the end of the experiment, we evaluated the colon morphology, composition of gut microbiota, intestinal fatty acids, integrity of intestinal barrier and blood-brain barrier (BBB), and neuroplasticity markers in the cerebral cortex and hippocampus. Obese rats showed dysbiosis, morphological changes, short-chain fatty acids (SCFAs) reduction, and increased saturated fatty acids in the colon. BBB may also be compromised in CAF-fed animals, as the claudin-5 expression is reduced in the cerebral cortex. In addition, synaptophysin was decreased in the hippocampus, which may affect synaptic function. Our findings showed that Zn could not protect obese animals from intestinal dysbiosis. However, an increase in acetate levels was observed, which suggests a partial beneficial effect of Zn. Thus, Zn supplementation may not be sufficient to protect from obesity-related dysfunctions.

Keywords: obesity; cafeteria diet (CAF); inflammation; gut microbiota; short-chain fatty acid (SCFA); zinc (Zn)

1. Introduction

Zinc (Zn) is a mineral widely distributed throughout the human body in small concentrations, which is involved in several biochemical and enzymatic processes (1–3). It is an enzymatic cofactor for several enzymes that regulate the metabolism of carbohydrates, proteins, and lipids (1,3). In addition, it exerts beneficial effects on the immune function, inflammatory response, contributes to barrier integrity, and cognitive processing (2–7). Moreover, it has already been established that obesity can affect the distribution of Zn in the body, reducing its systemic availability in obese individuals (8,9). Previous studies have shown that Zn supplementation may improve anthropometric measurements and reduce inflammatory markers, insulin resistance, oxidative stress, and obesity-related neuroinflammation. Thus, Zn supplementation reduces metabolic dysfunction and may decrease neurological impairment related to obesity (10–12). The consumption of processed energy-dense food, combined with overeating, urbanization, and a sedentary lifestyle in modern Western societies, is likely a major contributor to the obesity epidemic (13–15). Obesity is associated with a low-grade inflammation, which is characterized by increased production of proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and interleukin-6 (IL-6) (16–18). As a result of this inflammatory state, this complex and multifactorial disease implicates in a higher prevalence of metabolic disorders, such as type 2 diabetes, cardio-metabolic disease, non-alcoholic liver disease, and also dysbiosis of the gut microbiota and neurological impairment (15,19).

Another consequence of low-grade systemic inflammation is the disruption of the intestinal epithelial barrier and blood-brain barrier (BBB), which lead to neuroinflammation (20,21). The BBB comprises the tight junctions complex assembled by several proteins, such as transmembrane, cytoplasmic attachment, and cytoskeleton proteins that form epithelial barriers (22,23). Zonula occludens-1 (ZO-1), claudin-5, and occludin are recognized as markers of the integrity of BBB due to their critical role in maintaining the integrity of tight junctions (24,25).

Besides BBB dysfunction and neuroinflammation, neuroplasticity might be affected following inflammatory conditions, such as obesity. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a protein of the neurotrophin family, which is essential for neuronal development, maintenance, survival, cognitive function, and synaptic plasticity. In addition, it is considered a key regulator of synaptic transmission, mainly in the hippocampus and neocortex (6,26). Synaptophysin is a protein present in presynaptic vesicles. It participates in synaptic formation and neurotransmitter release. Also, it is used as a marker of synapsis distribution and density (27–29). Thus, in the present study, we investigated BDNF and synaptophysin to assess whether consuming ultra-processed and hypercaloric food might affect neuroplasticity.

Regarding gut microbiota, there is a high variability of microorganisms in its composition depending on dietary habits (30,31). Also, several diseases can be associated with a certain microbiota

profile (32–34). Previous studies have indicated that obesity is linked with disruptions in the gut microbiota composition, creating an imbalance in the microbial ecosystem defined as dysbiosis (35–37). In addition, in healthy conditions, commensal anaerobic colonic bacteria produce functional metabolites by highly-fermentable dietary fibers and resistant starch that benefit their host (38). Short-chain fatty acids (SCFA) are functional metabolites represented mainly by acetate, butyrate, and propionate. These metabolites promote intestinal epithelium integrity, regulate immune function, modulate neurotransmission, and appear involved in neuroimmunoendocrine regulation (39,40). Unbalanced SCFA concentrations due to consuming a Western diet can lead to dysbiosis. Subsequently, it corroborates an increased intestinal permeability and induces low-grade systemic inflammation (19,41).

Although Zn's role in decreasing inflammation and improving cognition is already described, its effect on reversing the harmful consequences of consuming ultra-processed foods on the microbiota composition and neuroplasticity is still unclear. The main aim of this study was to investigate the effects of Zn supplementation on the intestinal microbiota, intestinal barrier, and BBB in Wistar rats fed with a cafeteria diet (CAF). The CAF mimics the foods consumed by Western civilization by exposing the animals to highly palatable energy-dense foods with a high content of saturated fat and refined sugars and a large amount of food additives (42,43). This model elicits obesity-related disorders, such as dysbiosis, leaky gut, metabolic disorders, low-grade systemic inflammation, neuroinflammation, and behavioral dysfunctions in rodents (42,44). As expected, the chronic consumption of the CAF for 20 weeks increased body weight, as shown in a previous study (10). Thus, the present work also aimed to evaluate Zn's ability to reverse the mentioned harmful effects of obesity since its supplementation started after obesity had already been developed.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Male Wistar rats, three months old, were obtained from the facility of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA). Only male rats were used to avoid hormonal fluctuation and its possible impact on the results of this study. During the period of diet administration, one or two animals were housed per cage, in a temperature-controlled environment ($21^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$), under a 12-hour light/dark cycle and with ad libitum diet and water. The study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of UFCSPA under the protocol number 570/18. All research procedures were designed to minimize animal's number and suffering.

2.2. Experimental Groups and Diet

Twenty-eight animals were divided into 4 groups ($n = 7/\text{group}$), namely: (i) control group (CT); (ii) control group + zinc (CT Zn); (iii) cafeteria group (CAF), and (iv) cafeteria + zinc group (CAF Zn). Standard chow (CT) or cafeteria (CAF, high-fat and high-calorie) diets

were administered for 20 weeks. The cafeteria diet consisted of the alternating offer of three menus per week, containing bacon mortadella (Perdigão®), strawberry-flavored biscuits (Isabela®), chocolate biscuit (Isabela®), pizza-flavored hot cracker (Parati®), white chocolate (Harald®), orange-flavored soda (Sukita®) sausage (Alibem®) offered concomitantly with ad libitum standard chow and water. The alternation between cafeteria diet menus was performed every two days in order to maintain novelty. This diet's average energy supply was 4.5 Kcal/g (42 % carbohydrates, 16 % proteins, 42 % lipids). The standard diet consisted of the standard chow Nuvilab CR-1 provided by the animal facility of UFCSPA (Nuvital®, Brazil), which had an average energy supply of 3.4 Kcal/g (63 % carbohydrates, 26 % proteins, 11 % lipids). The total energy content of the CAF was calculated based on manufacturer's information. Leftovers were evaluated, and food consumption was calculated at the end of the experiment. The average energy consumption of CT groups was 771.5 Kcal/day, while CAF groups consumed 963 Kcal/day (10).

2.3. Zn Treatment

Chelated zinc bisglycinate (Deconto Farma®, Brazil) was administered at a dose of 10 mg/Kg/day by gavage for 4 weeks from the 16th week of the diets. Gavage was performed daily between 2-3 pm, during the light cycle. Animals that did not receive zinc supplementation were also subjected to gavage with vehicle solution (water, 0.5 ml per animal). Animals were weighed weekly to determine weight gain. It should be noted that the treatment with zinc was started after obesity had already been induced. Zn content in the liver and cerebellum was determined by flame atomic absorption spectrometry (model AA 7000F; Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a hollow cathode lamp and a deuterium lamp as a background corrector, and its dosage was previously published (10).

2.4. Tissue, Blood and Feces Collection

At the end of the experimental period of 20 weeks, the animals were euthanized by decapitation without anesthesia. After that, feces were collected directly from the proximal colon. The proximal portion of the colon and brain were also collected. The brain was dissected out and the hippocampus and cerebral cortex were stored at -80°C for further homogenization and analysis.

2.5. Histological Analysis

Histology of the proximal colon was performed for the general morphological analysis. Three to five animals per group were used for histology. For this, the tissue was fixed in paraformaldehyde, posteriorly embedded in a paraffin block, and cut transversely to a thickness of 4 µm. After this, the sections were stained with hematoxylin and eosin (HE). The slides were then analyzed under an EVOS microscope (EVOS Cell Imaging Systems, ThermoFisher Scientific). At least six measurements were taken per animal at 10x

magnification. The crypt depth was measured using ImageJ software, and the size was normalized to a 500µm scale (45).

2.6. Next-Generation Sequencing 16s rRNA

Stool sample was collected in sterile tubes and immediately stored at -20°C. We also used samples from CT and CAF groups provided from a previous experiment using the same diet protocol, and then the sample size was 8 animals for these groups. The genomic material of microbial DNA was obtained from approximately 200 mg of a fecal sample with a specific extraction kit (Microbiome DNA Purification kit, Invitrogen®) following the manufacturer's instructions. After DNA extraction, the quantification of the DNA of each sample was performed by a NanoDrop spectrophotometer (Shimadzu, Japan). The libraries were prepared from an average of 5 to 10 µg of genomic material.

The hypervariable V3-V4 region from 16S ribosomal RNA (rRNA) gene was amplified through PCR using genomic DNA (approximately 50 ng per reaction) and the following primer pair: 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') and 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'). In order to pool different samples in the same reaction, the primer-fusion method and each sample had a distinct barcode attached on the corresponding PCR product. The amplification was performed using Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen®). The products were verified through electrophoresis in an agarose gel, purified with AMPure XP PCR Purification Kit (Cat# A63881, Beckman Coulter Inc. Life Sciences), quantified using Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen®) and subjected to emulsion PCR using Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit (Cat# A29900, Thermo Fisher Scientific). After, the resulting enriched beads were sequenced in a Next-Generation Sequencing (NGS) machine (Ion Torrent PGM™, Life Technologies) using Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit (Cat# A30044, Thermo Fisher Scientific).

The 16S rRNA reads generated by high-throughput sequencing were submitted to a quality control analysis that retained sequences with a minimum length of 100 base pairs and trimmed the sequences to remove low quality bases to obtain a minimum Phred score of 30, using PRINSEQ (46). The remaining sequences were dereplicated and sorted by decreasing read abundance and filtered to exclude singletons using USEARCH v7.0.1090. Clusters were assembled using a minimum identity of 99 % and chimeras were removed using the Ribosomal Database Project (RDP) reference database (47).

The taxonomic assignment was obtained using QIIME v1.7 (48). Operational taxonomical units (OTUs) were selected based on 97 % sequence similarity and taxonomic data were obtained using a classification algorithm with the 97 % OTUs version of GreenGenes 13.8 (49). Diversity index was calculated utilizing Vegan:ecological diversity package in R.

2.7. Determination of Fatty Acid Profile

The levels of saturated fatty acid (SFA) and SCFA were measured in the large intestine of the animals. Determination of SFA was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). For this, 100 mg of intestinal tissue samples were homogenized in 1 mL of deionized water. After that, an aliquot of 50 μ L of the homogenate was used for extraction of the fatty acids with the addition of 950 μ L of a chloroform/methanol (2:1, v/v) solution and one drop of concentrated hydrochloric acid (HCl), were added to a plastic eppendorf tubes, forming a single liquid phase. Subsequently, 200 μ L of deionized water were added, promoting a separation between the chloroform phase (rich in lipids) and a methanol/aqueous phase. The samples were decanted for 5 min at room temperature. Then, the entire fraction containing chloroform was collected, dried under nitrogen flow at room temperature and stored at -20 °C. Thereafter, the samples were finally resuspended in 30 μ L of methanol and 2 μ L aliquots and then injected into an analytical system consisting of a gas chromatograph model GC-2010 A PLUS coupled to the QP-2010 Ultra mass spectrometer (Shimadzu, Japan) adapted from G. DEMERS et al (50). The spectrometer was operated in scan mode (50 – 700 m/z) and the results obtained were verified by comparing the findings with those described in the mass spectral reference library of the National Institute of Standards and Technology (NIST).

The determination of SCFA in the large intestine was performed by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), according to a protocol developed in-house. For this, it was added 50 μ L of the homogenate, 20 μ L NaOH (2 M) and 175 μ L of HCl (2 M) to plastic eppendorf tubes followed by vortexing for 30 seconds. The samples were then centrifuged for 6 minutes at 12.000 g. After that, an aliquot of 175 μ L of the supernatant was collected and transferred to a glass vial. In order to promote fatty acid derivatization, 25 μ L of 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH) was added. The flask was closed and incubated for 30 minutes at 40 °C. Then, 100 μ L of the mixture was transferred to a vial and 100 μ L of acetonitrile was added. Thereafter, an aliquot of 10 μ L was injected into the analytical system equipment. The LC-MS/MS equipment consisted of a chromatographic system Nexera UFLC (Shimadzu, Japan) equipped with two binary pumps (LC-30AD), a column oven (CTO-30A), a diode array absorbance detector (SPD-M20A) and an automatic injector (SIL-30AMP) coupled with a quadrupole mass spectrometer model LCMS-8045 (Shimadzu, Japan). The results obtained were processed and evaluated using LabSolutions software (Shimadzu, Japan).

2.8. Western Blotting

Protein expression of ZO-1, claudin-5, BDNF, synaptophysin was analyzed in the cerebral cortex, hippocampus and proximal colon. Tissues were processed and homogenized in a lysis buffer and then, samples were centrifuged for 10 minutes at 8.000 rpm. After the protein quantification by Bradford protein assay, Laemmli buffer were mixed with 30 μ g of proteins and heated 90 °C for 2 minutes. Proteins were loaded and separated by SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate

polyacrylamide gel electrophoresis) gel and later transferred to nitrocellulose membranes using a transfer system with semi-dry equipment (mini Trans-blot Electrophoretic Transfer Cell, BioRad), at 110 V for 1-2 h. Membranes were incubated with 8 % powdered milk in saline Tris buffer containing 0.1 % tween 20 (T-TBS) for 90 min, in order to block nonspecific binding. Membranes were incubated overnight (at 4 °C) with the primary antibody. Primary antibodies to TLR-4 (1:500, Cat# sc-293072, Santa Cruz Biotechnology®), ZO-1 (1:500, Cat# 61-7300, Invitrogen®), claudin-5 (1:1000, Cat# ABT45, Merk®), BDNF (1:1000, Cat# BS-4989R, Thermo Fisher Scientific), synaptophysin (1:500, Cat# MA5-14532, Thermo Fisher Scientific) were used. Then, the membranes were incubated with secondary antibodies anti-mouse (Cat# A9044, Sigma-Aldrich) or anti-rabbit (Cat# AP132P, Merk) for 2 h at room temperature. All incubations were performed under constant agitation and between each incubation, membranes were washed with T-TBS. A chemiluminescence reaction was performed to detect the labeled proteins and the images were obtained using the ChemiDoc MP photodocumenter (Bio-rad Laboratories). The results of each membrane were relative to the values found by incubating them with the primary antibody anti- β -actin (1:500, Cat# sc-47778 horseradish peroxidase, Santa Cruz Biotechnology®) or with nonspecific bands (51). To avoid inter-assay variations, samples from all experimental groups were processed in parallel.

2.9. Statistical Analysis

Data are expressed as mean and standard error of the mean (SEM). Two-way analysis of variance (ANOVA) was performed. The main factors were: diet (CT or CAF) and supplementation (vehicle or zinc). Bonferroni test was used for post hoc analysis. The value of $p < 0.05$ was considered as indicative of statistical significance. All analyzes were performed using the GraphPad Prism® 9.0 program (San Diego, CA, U.S.A.).

3. Results

3.1. Colon Morphology

The analysis of the crypt depth of the colon is shown in Figure 1. Crypt depth was lower in CAF-fed animals when compared with CT-fed animals (diet effect: $F_{1,146}=20.11$, $p < 0.0001$). Zn supplementation did not exert any effect on crypt depth measurements.

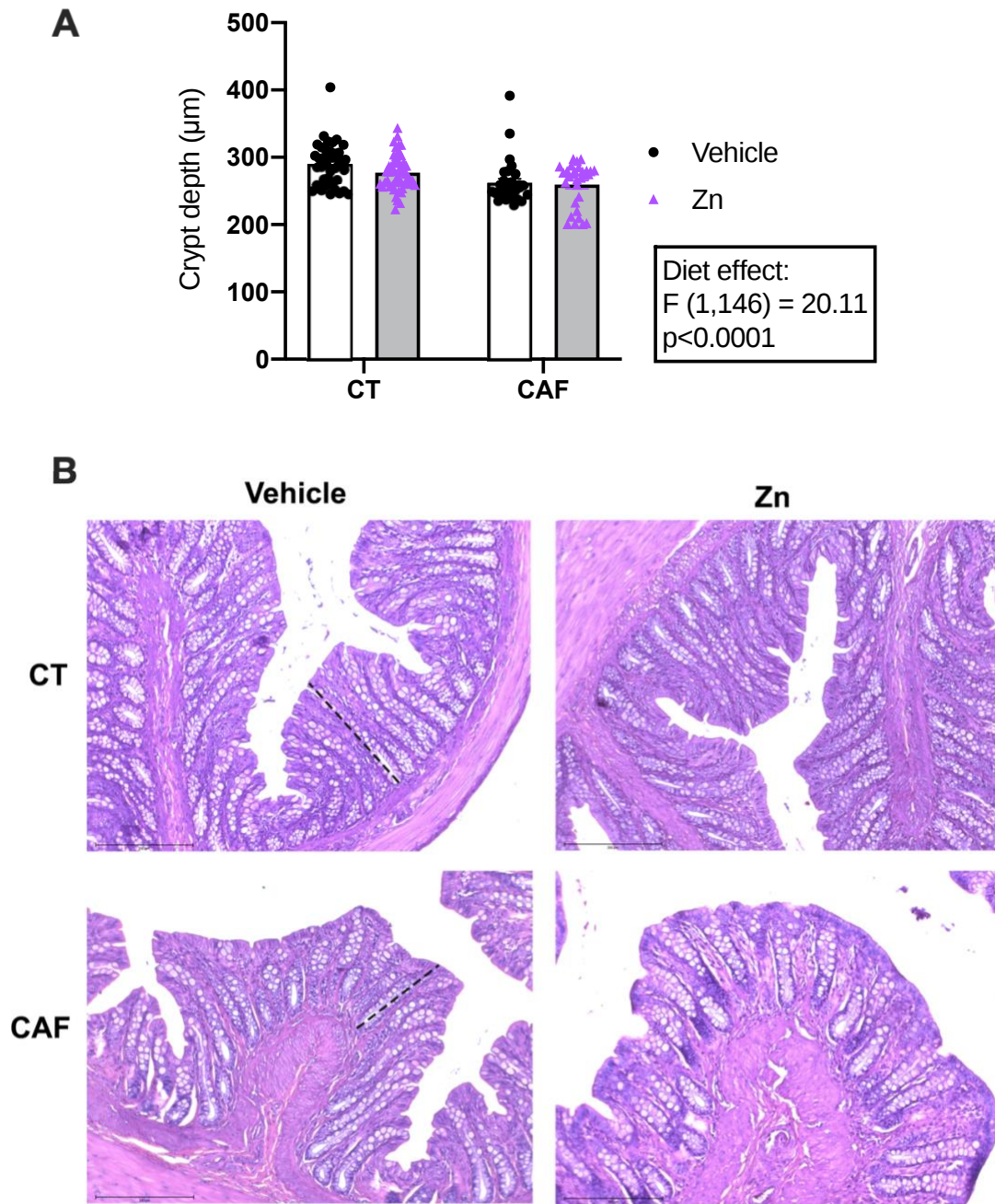


Figure 1. Crypt depth measurement in the proximal portion of the colon of control (CT) and cafeteria diet (CAF)-fed rats. (A) Crypt depth was reduced following CAF. (B) Representative images of each group of the colon stained with hematoxylin and eosin. The dashed lines indicate crypt length. Scale bar: 200 μm . The text box indicates significant differences shown by two-way ANOVA regarding the effects of the diet (CT and CT+Zn vs CAF and CAF+Zn) and Zn treatment (CT and CAF vs CT+Zn and CAF+Zn). $n = 3\text{--}5$ animals/group, 10 measurements per animal.

3.2. Composition of the Gut Microbiota

We performed the next-generation sequencing of the V4 16S rRNA region for the taxonomic identification of intestinal bacterial composition. The heatmap (Fig. 2A) shows the number of reads of the main phyla and genera. Significant differences regarding diet and Zn supplementation (two-way ANOVA main effects) and the multiple comparisons (post-hoc Bonferroni test) are described below.

We found a decrease in the Firmicutes phylum in CAF-fed rats (diet effect, $F_{1,9}=13.55$, $p=0.0016$). Also, the post-hoc test showed a significant decrease of Firmicutes bacteria in CAF+Zn compared to the CAF group ($p=0.0307$). On the other hand, Bacteroidetes phylum was significantly increased following CAF (diet effect, $F_{1,16} = 40.83$, $p<0.0001$), but it also showed a Zn supplementation effect ($F_{1,16}=5.596$, $p=0.0310$) and an interaction between diet and Zn ($F_{1,16} = 7.121$, $p=0.0168$). Bonferroni post-test also showed an increase in CAF+Zn compared to CAF group ($p=0.0079$). These findings show that Zn supplementation was able to decrease the abundance of Firmicutes bacteria while increasing Bacteroidetes phylum in CAF+Zn group. There was no difference in the abundance of Actinobacteria phylum among the groups. The Proteobacteria phylum showed an interaction between diet and Zn ($F_{1,17}=5.991$, $p=0.0255$), a diet effect ($F_{1,17}=65.03$, $p<0.0001$) and Zn effect ($F_{1,17}=5.838$, $p=0.0272$). Also, CAF+Zn showed a significantly higher abundance of Proteobacteria when compared to CAF group ($p=0.0101$). These findings show, once again, that Zn supplementation was able to increase the abundance of Proteobacteria phylum only in CAF-fed rats.

Regarding the genus taxonomic level, we analyzed the *Akkermansia*, *Bifidobacterium*, *Blautia*, *Clostridium* and *Lactobacillus*. There was an increase in the abundance of *Akkermansia* (diet effect, $F_{1,18}=6.520$, $p=0.0200$) and *Blautia* (diet effect, $F_{1,18}=36.07$, $p<0.0001$) in CAF-fed rats, with no effect of Zn supplementation for both genera. Concerning *Lactobacillus*, we found an interaction between diet and Zn ($F_{1,17}=6.583$, $p=0.0201$), diet effect ($F_{1,17}=37.34$, $p<0.0001$) and Zn effect ($F_{1,17}=13.80$, $p=0.0017$). It was also observed a significant decrease in *Lactobacillus* abundance in CT+Zn compared to CT group ($p=0.0008$). These findings show that Zn supplementation was able to reduce the abundance of *Lactobacillus* only in lean rats. There was no difference in the abundance of *Bifidobacterium* and *Clostridium* genera among the groups.

The diversity of the gut microbiota based on the Chao1 index (Fig. 2B) was also analyzed, which showed a reduction in the CAF-fed groups (diet effect, $F_{1,20}=19.66$, $p=0.0003$), with no effect of Zn supplementation.

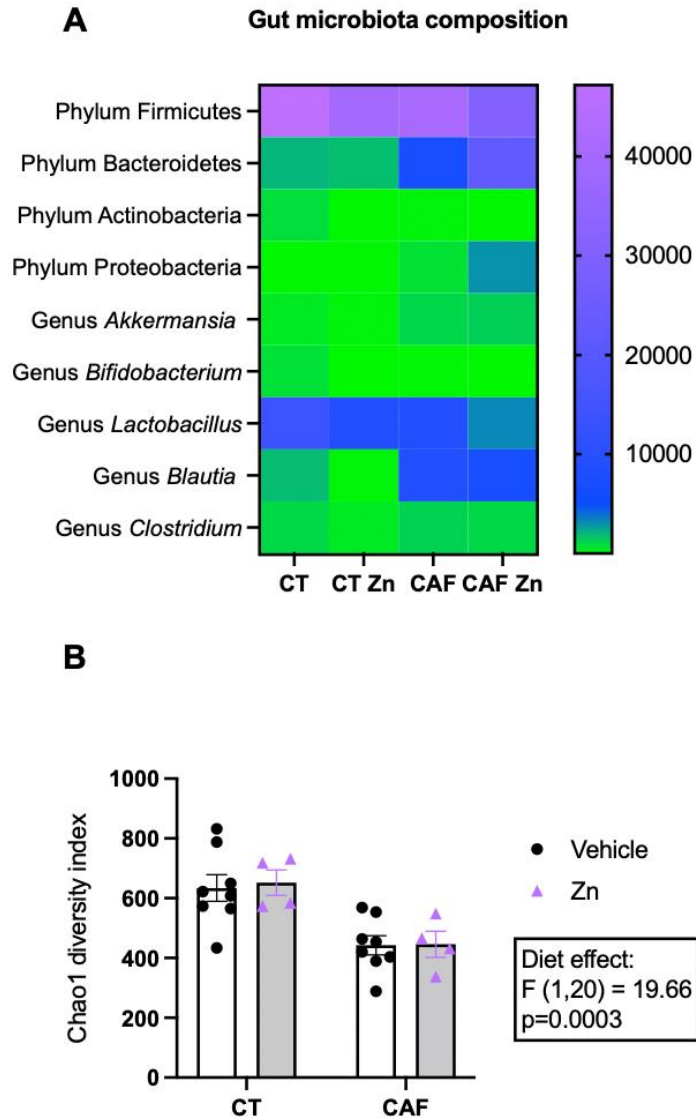


Figure 2. Composition of the gut microbiota of control (CT) and cafeteria diet (CAF)-fed animals. (A) Heatmap shows the phylum and genera levels of the main bacterial community found in the fecal samples of the intestinal colon. The range of colors, from green to lilac, indicates the abundance of each phylum or genera per group. (B) Chao1 diversity index. The text box indicates significant differences shown by two-way ANOVA regarding the effects of the diet (CT and CT+Zn vs CAF and CAF+Zn). $n=4-8$ animals/group.

3.3. SCFA, MCFA, LCFA and VLCFA Profile in the Intestine

The determination of SCFA in the intestine is shown in Figure 3. The acetate concentration (Fig. 3A) showed an interaction between diet and Zn ($F(1, 19) = 4.819$, $p = 0.0408$) and a Zn supplementation effect ($F(1, 19) = 4.753$, $p = 0.0420$). In the post-hoc comparisons, was observed an increase in acetate levels in the CAF+Zn group compared to CAF group ($p = 0.0188$). These findings demonstrate that Zn supplementation in obese rats could return the acetate concentration to the level of the lean animals. However, there was a diet effect ($F(1,19) = 5.238$, $p = 0.0337$) in

butyrate levels (Fig. 3B), which were decreased in CAF-fed rats with no effect of Zn supplementation. We noticed no difference in the concentration of propionate (Fig. 3C) and isobutyrate (Fig. 3D) among the groups. The valerate concentration (Fig. 3E) increased in Zn-supplemented rats (Zn effect, $F_{1,21}=4.754$, $p=0.0407$), with no effect of diet. Furthermore, we found decreased concentration of isovalerate (Fig. 3F) (diet effect, $F_{1,23}=6.526$, $p=0.0177$) in CAF-fed rats, with no effect of Zn supplementation.

The determination of medium-chain fatty acid (MCFA), long-chain fatty acid (LCFA) and very long-chain fatty acid (VLCFA) concentration in the intestinal tissue ($\mu\text{g}/\text{mg}$) is shown in Table 1. Regarding the MCFA, we analyzed the concentration of caprylic, decanoic, octanoic, lauric, and undecanoic acids. There was an increase of decanoic (diet effect, $F_{1, 23}=8.969$, $p=0.0065$), octanoic (diet effect, $F_{1, 23}=5.175$, $p=0.0326$) and lauric (diet effect, $F_{1, 23}=11.49$, $p=0.0025$) fatty acids in CAF-fed rats, with no effect of Zn supplementation. The undecanoic fatty acid showed an interaction effect between diet and Zn ($F_{1, 23}=5.716$, $p=0.0254$), in this case, post-hoc analysis showed that the CT+Zn group was higher than CT group ($p=0.0285$). Also, we observed decreased concentration of caprylic acid (diet effect, $F_{1,22}=4.387$, $p=0.0479$) in CAF-fed rats, with no effect of Zn supplementation. Moreover, we determined the concentration of the LCFA such as elaidic, heptadecanoic, linoleic, myristic, myristoleic, palmitic, pentadecanoic, stearic, and tridecanoic. Similarly, to the findings of MCFA, we noticed an increase in the concentration of elaidic (diet effect, $F_{1, 23}=34.12$, $p<0.0001$), linoleic (diet effect, $F_{1, 23}=14.46$, $p=0.0009$), myristic (diet effect, $F_{1, 23}=32.76$, $p<0.0001$), palmitic (diet effect, $F_{1, 19}=10.15$, $p=0.0049$) and stearic (diet effect, $F_{1, 21}=6.600$, $p=0.0179$) acids in response to CAF, with no effect of Zn. Also, the myristoleic acid showed an interaction effect between diet and Zn ($F_{1,20}=6.217$, $p=0.0215$). There was no difference in the concentration of heptadecanoic, pentadecanoic and tridecanoic acids among the groups. As for VLCFA, we analyzed the concentration of behenic, heneicosanoic, lignoceric, and tricosanoic acids. Again, it was observed an increase in behenic (diet effect, $F_{1, 23}=26.61$, $p<0.0001$) and heneicosanoic (diet effect, $F_{1, 23}=13.62$, $p=0.0012$) acids in CAF-fed animals, with no effect of Zn supplementation. No differences were seen in the concentration of lignoceric and tricosanoic acids among the groups.

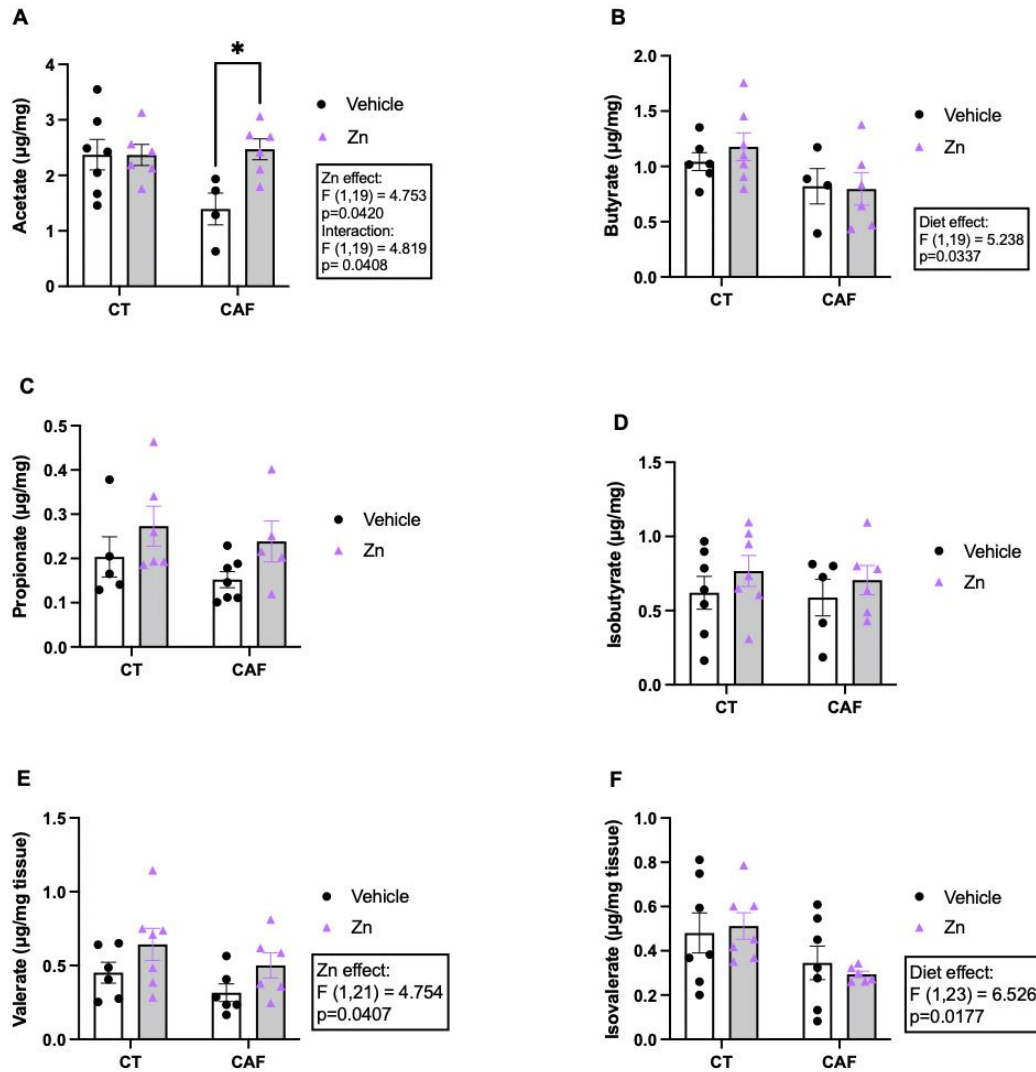


Figure 3. Short-chain fatty acids (SCFA) concentration in the proximal portion of the colon intestinal tissue of control (CT) and cafeteria diet (CAF)-fed rats. (A) Acetate, (B) Butyrate, (C) Propionate, (D) Isobutyrate, (E) Valerate and (F) Isovalerate levels. The text box indicates significant differences shown by two-way ANOVA regarding the effects of diet (CT and CT+Zn vs CAF and CAF+Zn), Zn supplementation (CT and CAF vs CT+Zn and CAF+Zn), and the interaction between diet and Zn supplementation. Multiple comparisons were performed by Bonferroni post-hoc test and significant differences are shown by the asterisk (* $p < 0.05$). $n = 4-7$ animals/group.

Table 1. T. Concentration of medium-chain fatty acid (MCFA), long-chain fatty acid (LCFA) and very long-chain fatty acid (VLCFA) concentration in the proximal portion of the colon intestinal tissue (µg/mg).

Fatty acid	Classification	CT	CT + Zn	CAF	CAF + Zn	Two-way ANOVA results			Bonferroni's Post-hoc test
						Interaction	Diet effect	Zn effect	
MCFA (6-12 carbons)									
Caprylic	Saturated	9.36 ± 4.14	5.78 ± 1.00	3.36 ± 0.93	3.67 ± 0.90		0.0479		
Decanoic	Saturated	0.32 ± 0.03	0.23 ± 0.04	0.65 ± 0.17	0.51 ± 0.10	ns	0.0065	ns	ns
Octanoic	Saturated	0.11 ± 0.03	0.09 ± 0.03	0.29 ± 0.08	0.19 ± 0.09	ns	0.0326	ns	ns
Lauric	Saturated	1.86 ± 0.31	1.44 ± 0.36	8.207 ± 2.05	5.72 ± 2.54	ns	0.0025	ns	ns
Undecanoic	Saturated	19.35 ± 3.12	11.07 ± 2.25	16.99 ± 1.42	19.49 ± 1.62	0.0254	ns	ns	CT vs CT + Zn (0.0285)
LCFA (13-21 carbons)									
Elaidic	Unsaturated trans fatty acid	61.41 ± 13.43	48.10 ± 15.02	244.9 ± 40.66	223.6 ± 44.51	ns	0.0001	ns	ns
Heptadecanoic	Saturated	3.71 ± 0.91	3.73 ± 0.99	3.82 ± 0.93	3.38 ± 1.24	ns	ns	ns	ns
Linoleic	Unsaturated	110.7 ± 18.36	76.81 ± 23.58	458.9 ± 114.2	322.6 ± 109.3	ns	0.0009	ns	ns
Myristic	Saturated	2.37 ± 0.85	2.50 ± 0.89	8.48 ± 0.89	5.77 ± 0.47	ns	0.0001	ns	ns
Palmitic	Saturated	28.83 ± 7.76	39.78 ± 9.52	47.52 ± 9.32	86.56 ± 27.04	ns	0.0049	ns	ns
Pentadecanoic	Saturated	14.21 ± 2.05	13.43 ± 1.07	18.61 ± 5.09	12.84 ± 1.22	ns	ns	ns	ns
Stearic	Saturated	59.69 ± 11.16	60.76 ± 10.34	34.22 ± 5.74	39.11 ± 4.99	ns	0.0179	ns	ns
Myristoleic	Unsaturated	29.96 ± 7.17	33.63 ± 7.39	52.10 ± 7.96	40.38 ± 10.15	0.0215	ns	ns	ns
Tridecanoic	Saturated	6.96 ± 1.52	4.98 ± 0.48	5.90 ± 1.03	5.65 ± 0.97	ns	ns	ns	ns
VLCFA (≥ 22 carbons)									
Behenic	Saturated	31.91 ± 7.10	32.14 ± 7.29	122.0 ± 33.77	182.6 ± 32.56	ns	0.0001	ns	ns
Tricosanoic	Saturated	25.90 ± 6.64	23.64 ± 3.88	43.57 ± 13.66	38.23 ± 13.53	ns	ns	ns	ns
Heneicosanoic	Saturated	11.31 ± 2.75	6.23 ± 2.05	27.86 ± 5.99	19.42 ± 4.10	ns	0.0012	ns	ns
Lignoceric	Saturated	12.68 ± 5.60	33.14 ± 7.72	19.64 ± 7.05	16.92 ± 5.35	ns	ns	ns	ns

Values are expressed as mean±SEM. p values are described when significant differences were found. ns (non-significant); CT (control diet); CAF (cafeteria diet); Zn (zinc). n=5/7 animals/group.

3.4. Blood-Brain Barrier (BBB) and Intestinal Barrier Integrity Components

The protein expression of ZO-1 and claudin-5 in cerebral cortex, hippocampus and proximal portion of the intestinal colon is shown in Figure 4. There was no difference in the ZO-1 expression in the cerebral cortex (Fig. 4A), hippocampus (Fig. 4C), and intestinal colon (Fig. 4E) among the groups. However, there was a decrease in claudin-5 protein expression in the cerebral cortex (Fig. 4B) of CAF-fed animals (diet effect, $F_{(1,17)}=11.16$, $p=0.0039$), with no effect of Zn supplementation. Intriguingly, we also observed a diet effect ($F_{(1,17)}= 6.889$, $p=0.0178$) in claudin-5 expression in intestinal colon (Fig. 4F), which was increased in CAF-fed rats, with no effect of Zn supplementation. Claudin-5 did not change among groups in the hippocampus (Fig. 4D).

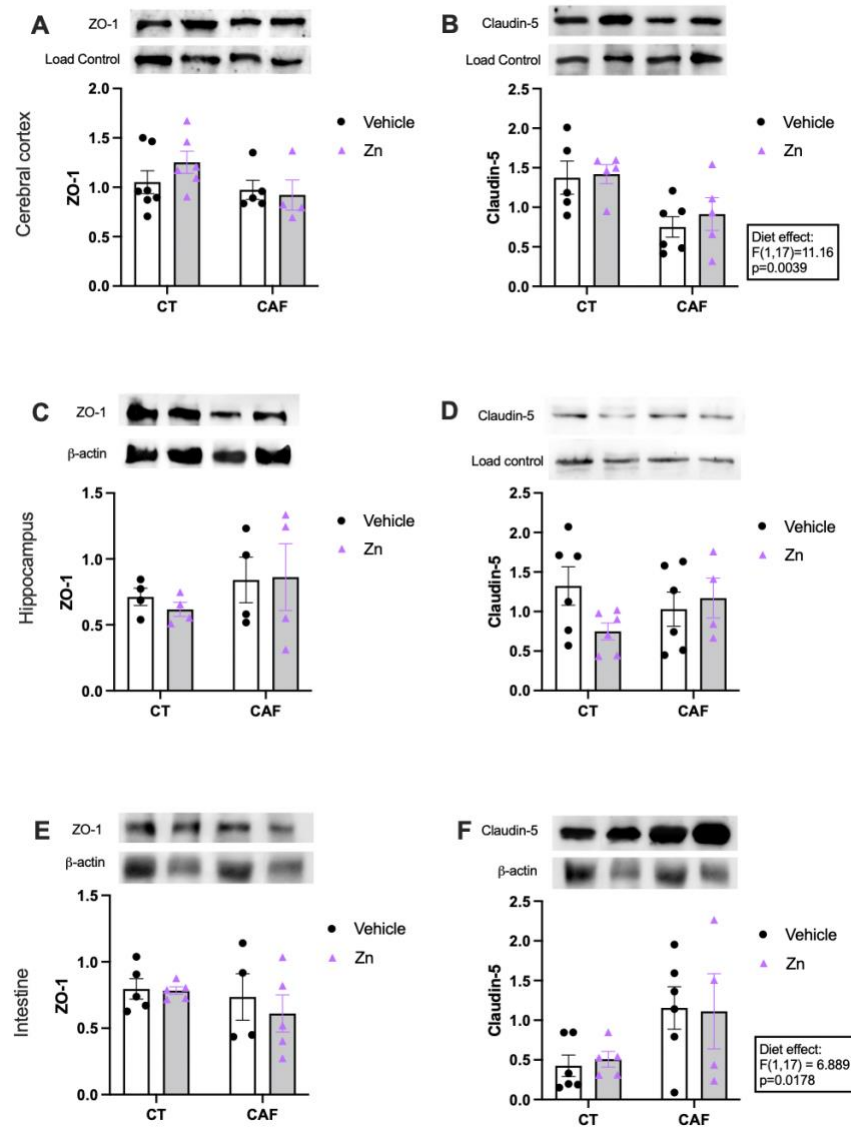


Figure 4. Protein expression of zonula occludens 1 (ZO-1) and claudin-5 in cerebral cortex (A, B), hippocampus (C, D), and proximal portion of the intestinal colon (E, F) in control (CT) and cafeteria diet (CAF)-fed rats. Representative bands of each group are shown on the top of the graphs. β -actin

or nonspecific bands were used as a loading control. The text box indicates significant differences shown by two-way ANOVA regarding effects of the diet (CT and CT+Zn vs CAF and CAF+Zn). $n=4-7$ animals/group.

3.5. Synaptic and Neuroplasticity Markers

The protein expression of synaptophysin and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cerebral cortex and hippocampus is shown in Figure 5. We found no difference in the protein expression of synaptophysin (Fig. 5A) in the cerebral cortex among the groups. However, there was a lower expression of synaptophysin in the hippocampus (Fig. 5B) of CAF-fed animals (diet effect, $F_{1,18}=16.69$, $p=0.0007$), with no effect of Zn supplementation. Moreover, BDNF expression in the hippocampus (Fig. 5C) did not change among the groups.

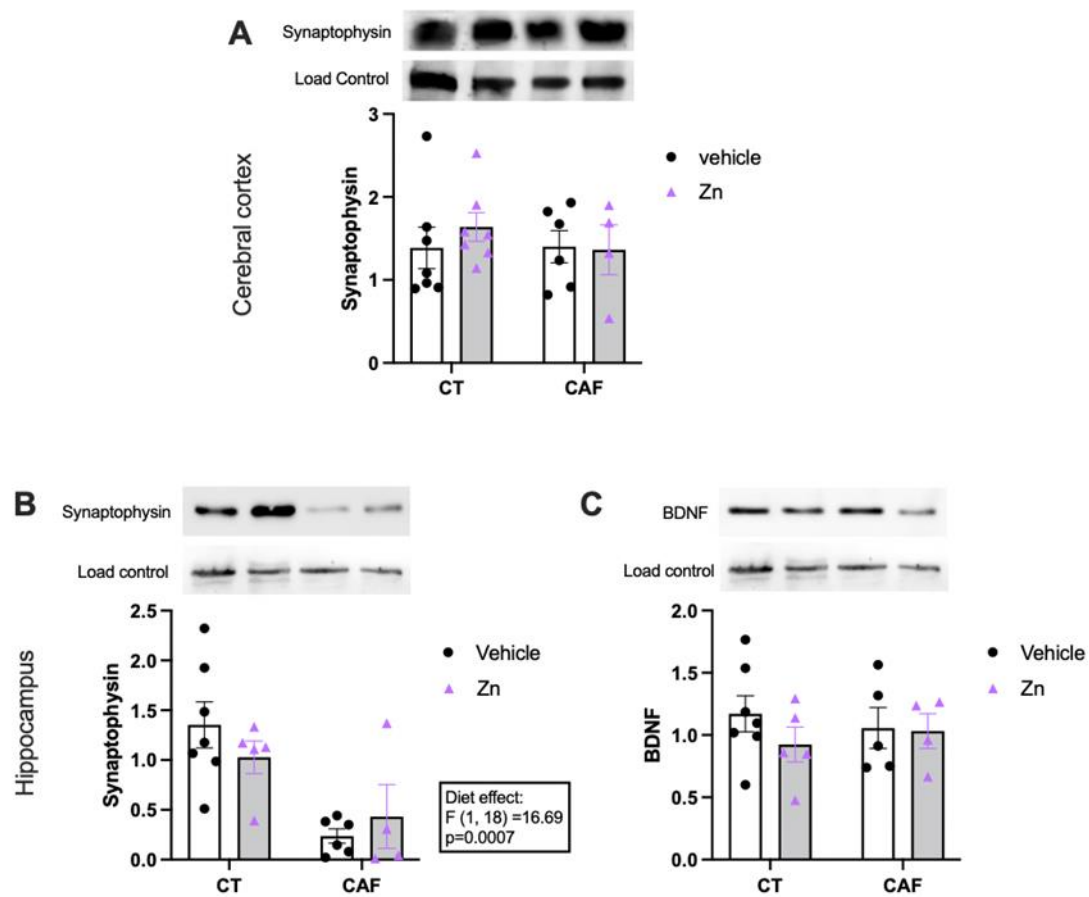


Figure 5. Protein expression of synaptophysin and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the cerebral cortex (A) and hippocampus (B, C) of control (CT) and cafeteria diet (CAF)-fed rats. Representative bands of each group are shown on the top of the graphs. β -actin or nonspecific bands were used as a loading control. The text box indicates significant differences shown by two-way ANOVA regarding the effects of diet (CT and CT+Zn vs CAF and CAF+Zn). $n=4-7$ animals/group.

4. Discussion

We have previously shown that Zn supplementation could decrease metabolic dysfunction and neuroinflammation and improve memory in obese rats fed with a CAF (10). Here we showed that Zn changed the microbiota composition but did not enhance its diversity in obese animals. Also, Zn was able to increase acetate levels in obese rats. On the other hand, Zn did not affect intestinal or cerebral barriers integrity or the expression of neuroplasticity markers such as synaptophysin and BDNF. Thus, we are showing that when obesity is severe, as we performed by the CAF experimental model, the effects of the Zn supplementation may not be as beneficial as those caused in other populations, such as normal body weight or even overweight people. These findings might help to delimit the recommendation of Zn supplementation to these groups.

There are some controversial findings regarding intestinal morphology in diet-induced obesity (DIO) models. Some studies reported an increase in the crypt depth or villi height in obesity (52–54). Zhou and collaborators found this result in the duodenum and jejunum but no differences in the colon of mice (55). It was also demonstrated that titanium dioxide, a coloring food additive, alters the functional absorption of nutrients by decreasing the number of microvilli and, consequently, reducing absorptive area. In addition, the same study showed that titanium dioxide significantly decreased zinc transport (56). Our findings showed that chronic ingestion of the CAF exerts a decrease in crypt depth of the colon in adult rats fed with CAF, with no effect of Zn supplementation. These findings may be related to the food additives present in the CAF.

In the present study, we also found that CAF modulated the intestinal microbiota composition and induced changes on its profile. Although there is a lack of definition of a “healthy microbiota” due to the high variability of microorganisms among the microbiota composition, there are some patterns at taxonomic levels of phyla in all vertebrates (57,58). In fact, several diseases are associated with a certain microbiota profile (32–34).

We demonstrated that CAF induced a decrease of Firmicutes and an increase of Bacteroidetes phyla abundance. In obese rats, Zn decreased Firmicutes while increased Bacteroidetes. There are some divergences among the studies regarding the abundance of these phyla. Although some reports demonstrated an increase in Firmicutes and a decrease in Bacteroidetes in obesity (42,59,60), others showed the opposite, or no difference in both phyla (44,61). However, the divergence in the literature may be related to the different diet protocols. It has already been shown that the diet composition, including the macronutrients and micronutrients distribution or even the presence of food additives, can modulate the gut microbiota profile (42,62,63). Furthermore, non-nutritive sweeteners, including acesulfame potassium, saccharin, and sucralose, exert a strong bacteriostatic effect. Consumption of these sweeteners can selectively inhibit the survival taxa of some bacterial populations, consequently changing gut microbiota homeostasis (64). Since CAF consists of

several ultra-processed foods and some of them have in their composition these sweeteners, it could have influenced our findings. In addition, the increase in the abundance of Bacteroidetes by Zn supplementation in CAF-fed rats seems interesting since it consists of several bacteria involved with SCFA production (30). Also, the higher proportion of Firmicutes phyla in obese rodents fed with a Western diet may be associated with an increase in the abundance of *Clostridium ramosum*, which has been linked to metabolic syndrome (65). Therefore, based on these findings, a protective effect of Zn supplementation could be suggested in CAF-fed rats.

Furthermore, we found an increase in the abundance of Proteobacteria phylum followed by CAF. Interestingly, obese animals that received Zn had an even higher abundance of this phylum. It is suggested that the increase in Proteobacteria is associated with an imbalance of the gut microbiota. Hence, it is a potential marker for dysbiosis (66). It has already been reported that increased colonization of Proteobacteria is associated with a high-fat diet (HFD) in both human and rodent models (60,67,68).

Among the analyzed genera, we found a decrease in the abundance of *Lactobacillus* following CAF and Zn supplementation, but Zn diminished *Lactobacillus* only in lean animals. *Lactobacillus* are beneficial bacteria with health-promoting properties, which have been reported as contributors to host metabolism (68,69). *Akkermansia* is a member of the Verrucomicrobia phylum, which corroborates the maintenance of metabolic homeostasis. It increases goblet cells density, stimulates mucin production, and improves intestinal barrier integrity (70,71). Indeed, studies have described the health-promoting effects of *Akkermansia* on energy metabolism and metabolic functions such as insulin sensitivity, dyslipidemia, and even cognition (72–74). Interestingly, at the same time that *Akkermansia* improves mucin production, it appears to be also involved in mucin degradation (75,76). *Akkermansia* is highly responsive to diet change. Previous DIO studies reported a higher prevalence of this genus (73,77) or even a decrease in its abundance (73,78). Here, we observed an increase in *Akkermansia* abundance following CAF. Thus, the mechanisms related to alterations in the *Akkermansia* population warrant further investigation. As for *Blautia* genera, we found an increase in its abundance following CAF. This finding is in accordance with previous studies on obesogenic diets both in humans and rodents (79,80). Again, while some studies reported deleterious effects linked with a higher abundance of *Blautia* (81,82), others reported beneficial effects (83).

Concerning the diversity taxa, it is consistently described that a higher diversity characterizes a healthy gut microbiota (58,84). Indeed, a lower microbiota richness is associated with an obesogenic diet in both humans and animals (42,80). We found a reduction of the alpha diversity in CAF-fed rats, in accordance with other studies (42,44,85). However, we did not find an effect of Zn supplementation in this analysis. Previous studies showed divergent effects of Zn on microbiota diversity. While some demonstrated that Zn supplementation tends to decrease overall bacterial richness (86),

others showed that low dietary Zn supplementation had no effect (87). In summary, our results suggest that Zn supplementation impacts bacterial communities by supporting or restricting the growth of selected taxa, corroborating with previous studies (76,86). However, CAF is composed of several industrialized foods, and our study does not provide evidence of the impact of a particular diet component on the microbiota, which is a limitation. Future studies should address this point.

SCFA are microbiota metabolites that modulate several host functions. Butyrate interferes in host metabolism and immunity by regulating satiety (88,89), exerting an anti-inflammatory role (32,90), maintaining epithelial integrity in the intestine (39), and also providing an energy source for colonocytes (90). Our findings showed a decrease in butyrate levels in CAF-fed animals, with no effect of Zn supplementation. The lower concentration of butyrate is in accordance with the decreased abundance of the Firmicutes phylum since butyrate-producing species belong to this phylum (62,91).

Acetate represents the most abundant SCFA in the body, being found in higher concentrations in blood and peripheral tissues (89,92). It is a metabolite synthesized by the phylum Bacteroidetes essential for the growth of several bacteria (62). Acetate is the main SCFA synthesized by intestinal bacteria and exerts an important effect on the body's energy regulation (58,93). Our findings demonstrated a significantly lower acetate concentration in the CAF group compared to the CAF+Zn group. Hence, Zn supplementation was capable of reestablishing the acetate concentration in CAF+Zn animals. Once again, higher concentration of acetate is in accordance with the enhanced abundance of Bacteroidetes phylum observed in CAF+Zn rats. A previous pre-clinical study reported an increase on the presence of gram-negative facultative anaerobic bacteria and the colonic concentration of SCFAs followed by Zn supplementation (94,95). We also showed lower concentrations of isovalerate following CAF and an increase in valerate concentration in rats supplemented with Zn. It is reported a beneficial effect of valerate in intestinal epithelial integrity and improvement of gastrointestinal function (96). Thus, Zn may exert a beneficial role by increasing valerate and acetate levels.

Regarding the concentration of SFAs in the colon, we observed an increase of several MCFA, LCFA, and VLCFA following CAF. The undecanoic and myristoleic fatty acids showed an interaction effect between diet and Zn supplementation. It has already been established that Zn is involved in several biochemical and enzymatic processes. Also, it is a part of desaturases and elongases and appears to influence the fatty acids profile. Changes in the amount of saturated fatty acids had already been reported following Zn supplementation (97). Overall, we expected a higher concentration of these fatty acids due to CAF composition, characterized by high saturated fatty acids content. Our findings are in accordance with previous studies concerning the quality and amount of dietary fat that modulates the gut microbiota composition and impacts metabolic health (98,99). Besides, it has already been reported that a high intake of dietary saturated fatty acids

contributes to the establishment of low-grade systemic inflammation and enhances the risk for development of obesity, cancer-related disease, and even impacts the onset of Alzheimer's and other dementias (79,100).

In addition, SFAs act as a non-microbial agonist of TLR-4, sharing a common mechanism of action with lipopolysaccharide (LPS), a constituent of intestinal bacteria related to endotoxemia (101). Moreover, it was demonstrated that saturated fatty acids stimulate the nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B) pathway in a TLR-4-dependent manner, leading to an increase in pro-inflammatory cytokines synthesis such as IL-6 and TNF- α (97,102). Among the analyzed fatty acids in the present study, palmitate and stearate are the main representatives of saturated fatty acids in the human organism, which were both increased in CAF-fed rats (97).

The excessive consumption of SFAs causes several consequences on the intestinal gut microbiota, including dysbiosis and dysfunction of the gut barrier, enhancing the proinflammatory state (13,31). Here, we analyzed the protein expression of ZO-1 and claudin-5 in the cerebral cortex, hippocampus, and intestine. There was no change in the ZO-1 expression in these three regions. Mice that received an HFD for 14 weeks showed a decrease in the protein expression of claudin-5 and occludin in the frontal cortex, while ZO-1 was not affected by diet (103). Regarding the claudin-5 protein expression in the hippocampus, we did not find differences between the groups. However, our findings showed a decrease in claudin-5 protein expression in the cerebral cortex of CAF-fed animals, with no effect of Zn supplementation. Intriguingly, we also observed an effect of diet in the claudin-5 expression in the intestine, which was increased in CAF-fed rats, with no effect of Zn supplementation. It has already been reported that the composition and distribution of epithelial claudins vary spatially along the length of the intestine. In intestinal inflammatory disorders, there is an overexpression of claudin-1, -2, and -18, simultaneously with the downregulation of claudin-3, -4, -5, -7, -8, and -12. Such changes can modify the epithelial barrier function and mucosal homeostasis (24,25). Thus, we speculate that the damage caused by CAF may alter the expression of other proteins, such as occludins or other claudins, which were not investigated here. Claudin-5 may increase to compensate for other alterations in the tight junction complex. Although we found no effect of Zn supplementation on the expression of the tight junction proteins, it has already been described that Zn may have a protective effect on the intestinal barrier. The mechanisms are not fully elucidated, but zinc-mediated protection seems to be due to the stimulation of GPR39, a zinc-sensing receptor involved in barrier regulation (104). Furthermore, Zn significantly enhanced the barrier function in an in vitro model (105).

The central nervous system is another important target of the harmful effects of obesity. It has already been described that there is a reciprocal interaction between gut microbiota and the central nervous system. This bidirectional communication, known as the gut-brain axis, is regulated via immune and neuroendocrine signals (106–108). Several

studies reported the association between gut microbiota dysbiosis and neurologic disorders, such as cognitive impairments, Alzheimer's disease (100), Parkinson's disease (109), autism spectrum (110), and mood disorders (111). Thus, we evaluated the effect of CAF on synaptophysin and BDNF, markers of neuroplasticity to further investigate the relationship between gut and brain in obesity.

Although the mechanisms are not fully elucidated, it appears that Zn implicates in the modulation of neurotrophic signaling (112–114). In this study, we did not find differences in BDNF expression in the hippocampus. However, studies in rodents reported that Zn supplementation could increase the expression of BDNF in the hippocampus and prevent cognitive impairment. Also, it seems that the effectiveness of Zn supplementation in increasing BDNF in obese mice was dose-dependent (115,116). We have previously shown that Zn diminished neuroinflammation and improved memory in obese rats. Thus, this mechanism of neuroprotection may be related to the reduction of inflammation without affecting BDNF expression. On the other hand, Zn supplementation in obese individuals increased the serum concentration of BDNF (117). However, studies in humans have a limitation due to the circulating BDNF not necessarily reflecting its availability and concentration in encephalic structures (118,119).

We also evaluated synaptophysin as a marker of neuroplasticity. Although changes in synaptophysin expression in the cerebral cortex were not seen, CAF reduced its expression in the hippocampus. It has already been reported a decreased synaptophysin expression in the hippocampus of rodents with an obesity-induced cognitive deficit (120). Cai and collaborators demonstrated that hyperglycemia and hyperlipidemia induced by obesity might enhance the hippocampal endoplasmic reticulum stress and impair the expression of BDNF and synaptophysin, consequently leading to memory and learning dysfunction in rats (121). However, it was previously shown that a low dose of Zn was efficient in increasing synaptophysin following a high-fat diet in mice (116).

5. Conclusions

In summary, we showed that chronic consumption of the CAF causes dysbiosis, morphological change, and a decrease in SCFA levels in the colon, along with increased saturated fatty acids. The BBB may also be compromised in CAF-fed animals since the claudin-5 expression is reduced in the cerebral cortex. Also, synaptophysin was decreased in the hippocampus, which might affect synaptic function. Zinc supplementation did not protect from dysbiosis. However, it increased acetate levels, which suggests a partial beneficial effect of Zn. In the brain, Zn did not show a neuroprotective role in the present study. Nevertheless, in accordance with previous studies, we have demonstrated a beneficial role of Zn in neuroinflammation and cognitive function in obesity. Thus, the consumption of ultra-processed foods, as provided by CAF, causes severe obesity. In this condition, Zn might not be sufficient to protect or revert obesity-related dysfunctions, such as dysbiosis

Author Contributions: Conceptualization, R.P.G. and M.P.; methodology, R.P.G., A.K.S., S.E., T.F.O. and J.C.F.M.; formal analysis, S.S., J.J., F.S.R. and M.G.; investigation, S.S., J.J., F.S.R.; writing—original draft preparation, S.S.; writing—review and editing, S.S. and R.P.G.; supervision, R.P.G., M.G., M.P.; project administration, R.P.G.; funding acquisition, R.P.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Research Support Foundation of Rio Grande do Sul (FAPERGS), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (protocol code 570/18 and date of approval 13/05/2018).

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available on reasonable request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Mangray S, Zweit J, Puri P. Zinc Deficiency in Cirrhosis: Micronutrient for Thought? *Dig Dis Sci*. 2015;60(10):2868–70. doi: 10.1007/s10620-015-3854-y.
2. Skalny A V., Aschnera M, Tinkov AA. Zinc. *Adv Food Nutr Res*. 2021;96:251-310. doi: 10.1016/bs.afnr.2021.01.003.
3. Mehri A. Trace Elements in Human Nutrition (II) – An Update. *Int J Prev Med*. 2020 Jan 3;11:2. doi: 10.4103/ijpvm.IJPVM_48_19.
4. Prasad AS. Discovery of human zinc deficiency: 50 years later. *J Trace Elem Med Biol*. 2012;26(2–3):66–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2012.04.004>.
5. Olechnowicz J, Tinkov A, Skalny A, Suliburska J. Zinc status is associated with inflammation, oxidative stress, lipid, and glucose metabolism. *J Physiol Sci*. 2018;68(1):19–31. doi: 10.1007/s12576-017-0571-7.
6. Travaglia A, La Mendola D. Zinc Interactions With Brain-Derived Neurotrophic Factor and Related Peptide Fragments. 1^o ed. Vol. 104, *Vitamins and Hormones*. Elsevier Inc.; 2017. 29–56 p. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.vh.2016.10.005>.
7. Mattei D, Pietrobelli A. Micronutrients and Brain Development. *Curr Nutr Rep*. 2019 Jun;8(2):99-107. doi: 10.1007/s13668-019-0268-z.
8. Gu K, Xiang W, Zhang Y, Sun K, Jiang X. The association between serum zinc level and overweight/obesity: a meta-analysis. *Eur J Nutr*. 2020;11(2):398-411. doi:10.1093/advances/nmz084.
9. Rios-Lugo MJ, Madrigal-Arellano C, Gaytán-Hernández D, Hernández-Mendoza H, Romero-Guzmán ET. Association of Serum Zinc Levels in Overweight and Obesity. *Biol Trace Elem Res*. 2020 Nov;198(1):51-57. doi: 10.1007/s12011-020-02060-8.
10. de Oliveira S, Feijó G dos S, Neto J, Jantsch J, Braga MF, Castro LF dos S, et al. Zinc Supplementation Decreases Obesity-Related Neuroinflammation and Improves Metabolic Function and Memory in Rats. *Obesity (Silver Spring)*. 2021 Jan;29(1):116-124. doi: 10.1002/oby.23024.
11. Fathi M, Alavinejad P, Haidari Z, Amani R. The effects of zinc supplementation on metabolic profile and oxidative stress in overweight/obese patients with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Trace Elem Med Biol*. 2020 Dec;62:126635. doi: 10.1016/j.jtemb.2020.126635.
12. Khorsandi H, Nikpayam O, Yousefi R, Parandoosh M, Hosseinzadeh N, Saidpour A, et al. Zinc supplementation improves body weight management, inflammatory biomarkers and insulin resistance in individuals with obesity: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Diabetol Metab Syndr*. 2019 Dec 2;11:101. doi: 10.1186/s13098-019-0497-8.
13. Malesza IJ, Malesza M, Walkowiak J, Mussin N, Walkowiak D. High-Fat, Western-Style Diet, Systemic Inflammation, and Gut Microbiota: A Narrative Review. *Cells*. 2021;10,3164. <https://doi.org/10.3390/cells10113164>.
14. Bray GA, Kim KK, Wilding JPH. Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation. *Obes Rev*. 2017;18(7):715–23.
15. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol* 15, 288–298 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>.
16. Pérez-Pérez A, Sánchez-Jiménez F, Vilariño-García T, Sánchez-Margalet V. Role of leptin in inflammation and

- vice versa. *Int J Mol Sci.* 2020 Aug 16;21(16):5887. doi: 10.3390/ijms21165887.
17. Christ A, Lauterbach M, Latz E. Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection. *Immunity.* 2019 Nov 19;51(5):794-811. doi: 10.1016/j.immuni.2019.09.020.
 18. Micioni Di Bonaventura MV, Martinelli I, Moruzzi M, Micioni Di Bonaventura E, Giusepponi ME, Polidori C, et al. Brain alterations in high fat diet induced obesity: Effects of tart cherry seeds and juice. *Nutrients.* 2020 Feb 27;12(3):623. doi: 10.3390/nu12030623.
 19. López-Taboada I, González-Pardo H, Conejo NM. Western Diet: Implications for Brain Function and Behavior. *Front Psychol.* 2020 Nov 23;11:564413. doi: 10.3389/fpsyg.2020.564413.
 20. Rodríguez-Gómez JA, Kavanagh E, Engskog-Vlachos P, Engskog MKR, Herrera AJ, Espinosa-Oliva AM, et al. Microglia: Agents of the CNS Pro-Inflammatory Response. *Cells.* 2020 Jul 17;9(7):1717. doi: 10.3390/cells9071717.
 21. Alexaki VI. The impact of obesity on microglial function: Immune, metabolic and endocrine perspectives. *Cells.* 2021 Jun 23;10(7):1584. doi: 10.3390/cells10071584.
 22. Rohr MW, Narasimhulu CA, Rudeski-Rohr TA, Parthasarathy S. Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. *Adv Nutr.* 2020 Jan 1;11(1):77-91. doi: 10.1093/advances/nmz061.
 23. Lochhead JJ, Yang J, Ronaldson PT, Davis TP. Structure, Function, and Regulation of the Blood-Brain Barrier Tight Junction in Central Nervous System Disorders. *Front Physiol.* 2020 Aug 6;11:914. doi: 10.3389/fphys.2020.00914.
 24. Markov AG, Aschenbach JR, Amasheh S. Claudin clusters as determinants of epithelial barrier function. *IUBMB Life.* 2015 Jan;67(1):29-35. doi: 10.1002/iub.1347.
 25. Garcia-Hernandez V, Quiros M, Nusrat A. Intestinal epithelial claudins: Expression and regulation in homeostasis and inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2017 Jun;1397(1):66-79. doi: 10.1111/nyas.13360.
 26. Park H, Poo MM. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci.* 2013 Jan;14(1):7-23. doi: 10.1038/nrn3379.
 27. Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F. Synaptophysin: Leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *BioEssays.* 2004 Apr;26(4):445-53. doi: 10.1002/bies.20012.
 28. Arthur CP, Stowell MHB. Structure of synaptophysin: A hexameric MARVEL domain channel protein. *Structure.* 2007 Jun;15(6):707-14. doi: 10.1016/j.str.2007.04.011.
 29. White DN, Stowell MHB. Room for Two: The Synaptophysin/Synaptobrevin Complex. *Front Synaptic Neurosci.* 2021 Sep 20;13:740318. doi: 10.3389/fnsyn.2021.740318.
 30. Rios-Covian D, Salazar N, Gueimonde M, de los Reyes-Gavilan CG. Shaping the metabolism of intestinal *Bacteroides* population through diet to improve human health. *Front Microbiol.* 2017 Mar 7;8:376. doi: 10.3389/fmicb.2017.00376.
 31. Rinninella E, Cintoni M, Raoul P, Lopetuso LR, Scaldaferri F, Pulcini G, et al. Food components and dietary habits: Keys for a healthy gut microbiota composition. *Nutrients.* 2019 Oct 7;11(10):2393. doi: 10.3390/nu11102393.
 32. Scheithauer TPM, Rampanelli E, Nieuwdorp M, Vallance BA, Verchere CB, van Raalte DH, et al. Gut Microbiota as a Trigger for Metabolic Inflammation in Obesity and Type 2 Diabetes. *Front Immunol.* 2020;11:571731. Published 2020 Oct 16. doi:10.3389/fimmu.2020.571731.
 33. Scheithauer TPM, Dallinga-Thie GM, de Vos WM, Nieuwdorp M, van Raalte DH. Causality of small and large intestinal microbiota in weight regulation and insulin resistance. *Mol Metab.* 2016 Jun 10;5(9):759-70. doi: 10.1016/j.molmet.2016.06.002.
 34. Meijnikman AS, Gerdes VE, Nieuwdorp M, Herrema H. Evaluating causality of gut microbiota in obesity and diabetes in humans. *Endocr Rev.* 2018 Apr 1;39(2):133-153. doi: 10.1210/er.2017-00192.
 35. Laura M. Cox, Blaser MJ. PATHWAYS IN MICROBE-INDUCED OBESITY. *Cell Metab.* 2013 Jun 4;17(6):883-894. doi: 10.1016/j.cmet.2013.05.004.
 36. Abenavoli L, Scarpellini E, Colica C, Boccuto L, Salehi B, Sharifi-Rad J, et al. Gut microbiota and obesity: A role for probiotics. *Nutrients.* 2019 Nov 7;11(11):2690. doi: 10.3390/nu11112690.
 37. Lee CJ, Sears CL, Maruthur N. Gut microbiome and its role in obesity and insulin resistance. *Ann N Y Acad Sci.* 2020 Feb;1461(1):37-52. doi: 10.1111/nyas.14107.
 38. Portincasa P, Bonfrate L, Vacca M, De Angelis M, Farella I, Lanza E, et al. Gut Microbiota and Short Chain Fatty Acids: Implications in Glucose Homeostasis. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3):1105. Published 2022 Jan 20. doi:10.3390/ijms23031105.
 39. Pérez-Reytor D, Puebla C, Karahanian E, García K. Use of Short-Chain Fatty Acids for the Recovery of the Intestinal Epithelial Barrier Affected by Bacterial Toxins. *Front Physiol.* 2021 May 24;12:650313. doi: 10.3389/fphys.2021.650313.
 40. Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020 Jan 31;11:25. doi: 10.3389/fendo.2020.00025.
 41. Feng Y, Wang Y, Wang P, Huang Y, Wang F. Short-Chain Fatty Acids Manifest Stimulative and Protective Effects on Intestinal Barrier Function Through the Inhibition of NLRP3 Inflammasome and Autophagy. *Cell Physiol Biochem.* 2018;49(1):190-205. doi: 10.1159/000492853.
 42. Bortolin RC, Vargas AR, Gasparotto J, Chaves PR, Schnorr CE, Martinello KB, et al. A new animal diet based on

- human Western diet is a robust diet-induced obesity model: Comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. *Int J Obes (Lond)*. 2018 Mar;42(3):525-534. doi: 10.1038/ijo.2017.225.
43. Zinöcker MK, Lindseth IA. The western diet–microbiome–host interaction and its role in metabolic disease. *Nutrients*. 2018 Mar 17;10(3):365. doi: 10.3390/nu10030365.
 44. Gual-Grau A, Guirro M, Mayneris-Perxachs J, Arola L, Boqué N. Impact of different hypercaloric diets on obesity features in rats: a metagenomics and metabolomics integrative approach. *J Nutr Biochem*. 2019 Sep;71:122–31. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.06.005.
 45. Seyyedini S, Nazem MN. Histomorphometric study of the effect of methionine on small intestine parameters in rat: An applied histologic study. *Folia Morphol*. 2017;76(4):620-629. doi: 10.5603/FM.a2017.0044.
 46. Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*. 2011 Mar 15;27(6):863-4. doi: 10.1093/bioinformatics/btr026.
 47. Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, et al. Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(D1):633–42. doi: 10.1093/nar/gkt1244.
 48. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ KR. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Geofis Int*. 2010 May;7(5):335-6. doi: 10.1038/nmeth.f.303.
 49. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Jul;72(7):5069-72. doi: 10.1128/AEM.03006-05.
 50. Demers G, Roy J, Machuca-Parra AI, Dashtehei pour Z, Bairamian D, Daneault C, et al. Fish oil supplementation alleviates metabolic and anxiodepressive effects of diet-induced obesity and associated changes in brain lipid composition in mice. *Int J Obes (Lond)*. 2020 Sep;44(9):1936-1945. doi: 10.1038/s41366-020-0623-6.
 51. König HG, Kögel D, Rami A, Prehn JHM. TGF- β 1 activates two distinct type I receptors in neurons: Implications for neuronal NF- κ B signaling. *J Cell Biol*. 2005;168(7):1077-1086. doi:10.1083/jcb.200407027.
 52. Segú H, Jalševac F, Pinent M, Ardévol A, Blay XT and MT. Intestinal Morphometric Changes Induced by a Western-Style Diet in Wistar Rats and GSPE Counter-Regulatory Effect. *Nutrients*. 2022;14(13):2608. Published 2022 Jun 23. doi:10.3390/nu14132608.
 53. Dailey MJ. Nutrient-induced intestinal adaption and its effect in obesity. *Physiol Behav*. 2014 Sep;136:74-8. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.03.026.
 54. Mah AT, Landeghem L Van, Gavin HE, Magness ST, Lund PK. Impact of diet-induced obesity on intestinal stem cells: Hyperproliferation but impaired intrinsic function that requires insulin/IGF1. *Endocrinol*. 2014 Sep;155(9):3302-14. doi: 10.1210/en.2014-1112.
 55. Zhou W, Davis EA, Dailey MJ. Obesity, independent of diet, drives lasting effects on intestinal epithelial stem cell proliferation in mice. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2018;243(10):826-835. doi:10.1177/1535370218777762.
 56. Zhongyuan Guo, Nicole J. Martucci, Fabiola Moreno-Olivas, Elad Tako and GJM. Titanium Dioxide Nanoparticle Ingestion Alters Nutrient Absorption in an In Vitro Model of the Small Intestine. *NanoImpact*. 2017 Jan;5:70-82. doi: 10.1016/j.impact.2017.01.002.
 57. Hooper LV, MacPherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol*. 2010 Mar;10(3):159-69. doi: 10.1038/nri2710.
 58. Fan Y, Pedersen O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol* 19, 55–71 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0433-9>.
 59. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: At the interface of health and disease. *Nat Rev Genet*. 2012 Mar 13;13(4):260-70. doi: 10.1038/nrg3182.
 60. Zhang C, Zhang M, Pang X, Zhao Y, Wang L, Zhao L. Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. *ISME J*. 2012 Oct;6(10):1848-57. doi: 10.1038/ismej.2012.27.
 61. Simpson HL, Campbell BJ. Review article: Dietary fibre-microbiota interactions. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015 Jul;42(2):158-79. doi: 10.1111/apt.13248.
 62. Requena T, Martínez-Cuesta MC, Peláez C. Diet and microbiota linked in health and disease. *Food Funct*. 2018 Feb 21;9(2):688-704. doi: 10.1039/c7fo01820g.
 63. Gentile CL, Weir TL. The gut microbiota at the intersection of diet and human health. *Science*. 2018 Nov 16;362(6416):776-780. doi: 10.1126/science.aau5812.
 64. Wang QP, Browman D, Herzog H, Gregory Neely G. Non-nutritive sweeteners possess a bacteriostatic effect and alter gut microbiota in mice. *PLoS One*. 2018 Jul 5;13(7):e0199080. doi: 10.1371/journal.pone.0199080.
 65. Woting A, Pfeiffer N, Loh G, Klaus S, Blaut M. Clostridium ramosum promotes High-Fat diet-induced obesity in Gnotobiotic Mouse Models. *MBio*. 2014 Sep 30;5(5):e01530-14. doi: 10.1128/mBio.01530-14.
 66. Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol*. 2015;33(9):496–503. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>.
 67. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Pouillet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Aug 17;107(33):14691-6. doi: 10.1073/pnas.1005963107.
 68. Wang J, Tang H, Zhang C, Zhao Y, Derrien M, Rocher E, et al. Modulation of gut microbiota during probiotic-

- mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *ISME J.* 2015 Jan;9(1):1-15. doi: 10.1038/ismej.2014.99.
69. Kang Y, Kang X, Yang H, Liu H, Yang X, Liu Q, et al. *Lactobacillus acidophilus* ameliorates obesity in mice through modulation of gut microbiota dysbiosis and intestinal permeability. *Pharmacol Res.* 2022 Jan;175:106020. doi: 10.1016/j.phrs.2021.106020.
 70. Macchione IG, Lopetuso LR, Ianiro G, Napol M, Gibiino G, Rizzatt G, et al. *Akkermansia muciniphila*: Key player in metabolic and gastrointestinal disorders. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019 Sep;23(18):8075-8083. doi: 10.26355/eurrev_201909_19024.
 71. de Vos WM. Microbe profile: *Akkermansia muciniphila*: A conserved intestinal symbiont that acts as the gatekeeper of our mucosa. *Microbiol.* 2017 May;163(5):646-648. doi: 10.1099/mic.0.000444.
 72. Ou Z, Deng L, Lu Z, Wu F, Liu W, Huang D, et al. Protective effects of *Akkermansia muciniphila* on cognitive deficits and amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nutr Diabetes.* 2020 Apr 22;10(1):12. doi: 10.1038/s41387-020-0115-8.
 73. Schneeberger M, Everard A, Gómez-Valadés AG, Matamoros S, Ramírez S, Delzenne NM, et al. *Akkermansia muciniphila* inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. *Sci Rep* 5, 16643 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep16643>.
 74. Huwart SJP, de Wouters d'Oplinter A, Rastelli M, Van Hul M, de Vos WM, Luquet S, et al. Food Reward Alterations during Obesity Are Associated with Inflammation in the Striatum in Mice: Beneficial Effects of *Akkermansia muciniphila*. *Cells.* 2022 Aug 16;11(16):2534. doi: 10.3390/cells11162534.
 75. Shin NR, Lee JC, Lee HY, Kim MS, Whon TW, Lee MS, et al. An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut.* 2015;33(9):496–503. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>.
 76. Barra NG, Anhê FF, Cavallari JF, Singh AM, Chan DY, Schertzer JD. Micronutrients impact the gut microbiota and blood glucose. *J Endocrinol.* 2021 Jul 28;250(2):R1-R21. doi: 10.1530/JOE-21-0081.
 77. Hamilton MK, Boudry G, Lemay DG, Raybould HE. Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2015 May 15;308(10):G840-51. doi: 10.1152/ajpgi.00029.2015.
 78. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013 May 28;110(22):9066-71. doi: 10.1073/pnas.1219451110.
 79. Bailén M, Bressa C, Martínez-López S, González-Soltero R, Montalvo Lominchar MG, San Juan C, et al. Microbiota Features Associated With a High-Fat/Low-Fiber Diet in Healthy Adults. *Front Nutr.* 2020 December 18; 7:583608. doi: 10.3389/fnut.2020.583608.
 80. Davis SC, Yadav JS, Barrow SD, Robertson BK. Gut microbiome diversity influenced more by the Westernized dietary regime than the body mass index as assessed using effect size statistic. *Microbiologyopen.* 2017 Aug;6(4):e00476. doi: 10.1002/mbo3.476.
 81. Ozato N, Saito S, Yamaguchi T, Katashima M, Tokuda I, Sawada K, et al. *Blautia* genus associated with visceral fat accumulation in adults 20–76 years of age. *npj Biofilms Microbiomes* 5, 28 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0101-x>.
 82. Ozato N, Yamaguchi T, Mori K, Katashima M, Kumagai M, Murashita K, et al. Two *Blautia* Species Associated with Visceral Fat Accumulation: A One-Year Longitudinal Study. *Biology (Basel).* 2022 Feb 16;11(2):318. doi: 10.3390/biology11020318.
 83. Liu X, Mao B, Gu J, Wu J, Cui S, Wang G, et al. *Blautia*—a new functional genus with potential probiotic properties? *Gut Microbes.* 2021 Jan-Dec;13(1):1-21. doi: 10.1080/19490976.2021.1875796.
 84. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature.* 2013 Aug 29;500(7464):541-6. doi: 10.1038/nature12506.
 85. Klingbeil E, de La Serre CB. Microbiota modulation by eating patterns and diet composition: Impact on food intake. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2018 Dec 1;315(6):R1254-R1260. doi: 10.1152/ajpregu.00037.2018.
 86. Popovic A, Bourdon C, Wang PW, Guttman DS, Soofi S, Bhutta ZA, et al. Micronutrient supplements can promote disruptive protozoan and fungal communities in the developing infant gut. *Nat Commun.* 2021 Nov 18;12(1):6729. doi: 10.1038/s41467-021-27010-3.
 87. Zackular JP, Moore JL, Ashley T, Jordan, Juttukonda LJ, Noto MJ, Nicholson MR, et al. Dietary Zinc Alters the Microbiota and Decreases Resistance to *Clostridium difficile* Infection. *Nat Med.* 2016 Nov;22(11):1330-1334. doi: 10.1038/nm.4174.
 88. Lin H V., Frassetto A, Kowalik EJ, Nawrocki AR, Lu MM, Kosinski JR, et al. Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PLoS One.* 2012;7(4):e35240. doi: 10.1371/journal.pone.0035240.
 89. Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ.* 2018 Jun 13;361:k2179. doi: 10.1136/bmj.k2179.
 90. Salvi PS, Cowles RA. Butyrate and the intestinal epithelium: Modulation of proliferation and inflammation in homeostasis and disease. *Cells.* 2021 Jul 14;10(7):1775. doi: 10.3390/cells10071775.

91. Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol*. 2017 Jan;19(1):29-41. doi: 10.1111/1462-2920.13589.
92. Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*. 2016 May 3;7(3):189-200. doi: 10.1080/19490976.2015.1134082.
93. Frost G, Sleeth ML, Sahuri-Arisoylu M, Lizarbe B, Cerdan S, Brody L, et al. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun*. 2014 Apr 29;5:3611. doi: 10.1038/ncomms4611.
94. Biesalski HK. Nutrition meets the microbiome: micronutrients and the microbiota. *Ann N Y Acad Sci*. 2016 May;1372(1):53-64. doi: 10.1111/nyas.13145.
95. Pieper R, Vahjen W, Neumann K, Van Kessel AG, Zentek J. Dose-dependent effects of dietary zinc oxide on bacterial communities and metabolic profiles in the ileum of weaned pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2012 Oct;96(5):825-33. doi: 10.1111/j.1439-0396.2011.01231.x.
96. Li Y, Dong J, Xiao H, Zhang S, Wang B, Cui M, et al. Gut commensal derived-valeric acid protects against radiation injuries. *Gut Microbes*. 2020 Jul 3;11(4):789-806. doi: 10.1080/19490976.2019.1709387.
97. Stawarska A, Czerwonka M, Wyřbiak R, Wrzesień R, Bobrowska-Korczak B. Zinc affects cholesterol oxidation products and fatty acids composition in rats' serum. *Nutrients*. 2021 May 6;13(5):1563. doi: 10.3390/nu13051563.
98. Wolters M, Ahrens J, Romaní-Pérez M, Watkins C, Sanz Y, Benítez-Páez A, et al. Dietary fat, the gut microbiota, and metabolic health – A systematic review conducted within the MyNewGut project. *Clin Nutr*. 2019 Dec;38(6):2504-2520. doi: 10.1016/j.clnu.2018.12.024.
99. Fritsche KL. The Science of Fatty Acids and Inflammation. *Adv Nutr*. 2015 May 15;6(3):293S-301S. doi: 10.3945/an.114.006940.
100. Hsu TM, Kanoski SE. Blood-brain barrier disruption: Mechanistic links between western diet consumption and dementia. *Front Aging Neurosci*. 2014 May 9;6:88. doi: 10.3389/fnagi.2014.00088.
101. Cândido TLN, Bressan J, Alfenas R de CG. Dysbiosis and metabolic endotoxemia induced by high-fat diet. *Nutr Hosp*. 2018 Dec 3;35(6):1432-1440. doi: 10.20960/nh.1792.
102. Wong SW, Kwon MJ, Choi AMK, Kim HP, Nakahira K, Hwang DH. Fatty acids modulate toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. *J Biol Chem*. 2009 Oct 2;284(40):27384-92. doi: 10.1074/jbc.M109.044065.
103. Pepping JK, Freeman LR, Gupta S, Keller JN, Bruce-Keller AJ. NOX2 deficiency attenuates markers of adiposopathy and brain injury induced by high-fat diet. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2013 Feb 15;304(4):E392-404. doi: 10.1152/ajpendo.00398.2012.
104. Suzuki T. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. *Anim Sci J*. 2020 Jan-Dec;91(1):e13357. doi: 10.1111/asj.13357.
105. Mercado J, Valenzano MC, Jeffers C, Sedlak J, Cugliari MK, Papanikolaou E, et al. Enhancement of tight junctional barrier function by micronutrients: Compound-specific effects on permeability and claudin composition. *PLoS One*. 2013 Nov 13;8(11):e78775. doi: 10.1371/journal.pone.0078775.
106. Mayer EA, Tillisch K, Gupta A. Gut/brain axis and the microbiota. *J Clin Invest*. 2015 Mar 2;125(3):926-38. doi: 10.1172/JCI76304.
107. Agustí A, García-Pardo MP, López-Almela I, Campillo I, Maes M, Romaní-Pérez M, et al. Interplay between the gut-brain axis, obesity and cognitive function. *Front Neurosci*. 2018 Mar 16;12:155. doi: 10.3389/fnins.2018.00155.
108. Margolis KG, Cryan JF, Mayer EA. The Microbiota-Gut-Brain Axis: From Motility to Mood. *Gastroenterology*. 2021 Apr;160(5):1486-1501. doi: 10.1053/j.gastro.2020.10.066.
109. Hill-Burns EM, Debelius JW, Morton JT, William TW, Lewis MR, Wallen ZD, et al. Parkinson's Disease and PD Medications Have Distinct Signatures of the Gut Microbiome. *Mov Disord*. 2017 May;32(5):739-749. doi: 10.1002/mds.26942.
110. Li Q, Han Y, Dy ABC, Hagerman RJ. The gut microbiota and autism spectrum disorders. *Front Cell Neurosci*. 2017 Apr 28;11:120. doi: 10.3389/fncel.2017.00120.
111. Wu W, Adame MD, Liou C, Barlow JT, Lai T, Schretter CE, et al. Microbiota regulate social behaviour via stress response neurons in the brain. *Nature*. 2021 Jul;595(7867):409-414. doi: 10.1038/s41586-021-03669-y.
112. Sensi SL, Granzotto A, Siotto M, Squitti R. Copper and Zinc Dysregulation in Alzheimer's Disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2018 Dec;39(12):1049-1063. doi: 10.1016/j.tips.2018.10.001.
113. Granzotto A, Canzoniero LMT, Sensi SL. A Neurotoxic Ménage-à-trois: Glutamate, Calcium, and Zinc in the Excitotoxic Cascade. *Front Mol Neurosci*. 2020 Nov 26;13:600089. doi: 10.3389/fnmol.2020.600089.
114. Jung JH, Park MH, Choi SY, Koh JY. Activation of the Trk signaling pathway by extracellular zinc. Role of metalloproteinases. *J Biol Chem*. 2005 Mar 25;280(12):11995-2001. doi: 10.1074/jbc.M403172200.
115. Corona C, Masciopinto F, Silvestri E, Viscovo A Del, Lattanzio R, Sorda RL, et al. Dietary zinc supplementation of 3xTg-AD mice increases BDNF levels and prevents cognitive deficits as well as mitochondrial dysfunction. *Cell Death Dis*. 2010 Oct 28;1(10):e91. doi: 10.1038/cddis.2010.73.
116. Nam SM, Kim JW, Kwon HJ, Yoo DY, Jung HY, Kim DW, et al. Differential Effects of Low- and High-dose Zinc Supplementation on Synaptic Plasticity and Neurogenesis in the Hippocampus of Control and High-fat Diet-fed Mice. *Neurochem Res*. 2017 Nov;42(11):3149-3159. doi: 10.1007/s11064-017-2353-2.

117. Solati Z, Jazayeri S, Tehrani-Doost M, Mahmoodianfard S, Gohari MR. Zinc monotherapy increases serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels and decreases depressive symptoms in overweight or obese subjects: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Nutr Neurosci*. 2015 May;18(4):162-8. doi: 10.1179/1476830513Y.0000000105.
118. Jafari F, Mohammadi H, Amani R. The effect of zinc supplementation on brain derived neurotrophic factor: A meta-analysis. *J Trace Elem Med Biol*. 2021 Jul;66:126753. doi: 10.1016/j.jtemb.2021.126753.
119. Sandrini L, Di Minno A, Amadio P, Ieraci A, Tremoli E, Barbieri SS. Association between obesity and circulating brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels: Systematic review of literature and meta-analysis. *Int J Mol Sci*. 2018 Aug 3;19(8):2281. doi: 10.3390/ijms19082281.
120. Martinelli I, Tomassoni D, Roy P, Amenta F, Tayebati SK. Altered brain cholinergic and synaptic markers in obese Zucker rats. *Cells*. 2021 Sep 24;10(10):2528. doi: 10.3390/cells10102528.
121. Cai M, Wang H, Li J, Jing, Zhang YL, Xin L, Li F, et al. The signaling mechanisms of hippocampal endoplasmic reticulum stress affecting neuronal plasticity-related protein levels in high fat diet-induced obese rats and the regulation of aerobic exercise. *Brain Behav Immun*. 2016 Oct;57:347-359. doi: 10.1016/j.bbi.2016.05.010.

5 CONCLUSÃO

No presente estudo, foi possível demonstrar que o consumo crônico de CAF causa disbiose da microbiota intestinal, alteração morfológica e diminuição dos níveis de AGCC no cólon, juntamente com aumento de ácidos graxos saturados. A BHE também pode estar comprometida em animais alimentados com CAF, uma vez que a expressão de claudina-5 é reduzida no córtex cerebral. Além disso, a sinaptofisina estava diminuída no hipocampo, o que pode afetar a função sináptica. O Zn desempenha um papel importante sobre o metabolismo de macronutrientes, apresenta ação anti-inflamatória e participa da manutenção da integridade da barreira intestinal. Entretanto, a suplementação de zinco não foi capaz de proteger os animais obesos que receberam CAF da disbiose intestinal. No entanto, aumentou os níveis de acetato, o que sugere um efeito benéfico parcial do Zn. Ademais, não foi observado um papel neuroprotetor do Zn no SNC. Todavia, estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa e também por outros pesquisadores já demonstraram um papel benéfico do Zn na neuroinflamação e função cognitiva associados à obesidade. Dessa forma, o consumo de alimentos ultraprocessados, conforme proporcionado pela CAF, é um modelo robusto para indução de obesidade e complicações de saúde. Nessa condição, o Zn pode não ser suficiente para proteger ou prevenir disfunções relacionadas à obesidade. Com base nesses resultados, embora seja amplamente demonstrado na literatura que suplementação de Zn apresenta efeitos benéficos sobre a saúde, deve-se ter cautela na sua indicação para o tratamento das disfunções associadas à obesidade.



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº: 226/19

2) DATA DO PARECER: 13-05-18

Parecer 570/18

3) TÍTULO DO PROJETO:

Modelo experimental de suplementação de ômega-3 ou zinco como estratégias para o combate aos efeitos metabólicos e neuroinflamatórios da obesidade.

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Renata Guedes

5) RESUMO DO PROJETO:

A obesidade ocasiona alterações metabólicas, causando secreção crônica de moléculas pró-inflamatórias. Este estado inflamatório desencadeia a ativação de vias de sinalização que favorecem a morte celular. Os órgãos metabólicos como intestino e fígado são diretamente afetados. O projeto pretende avaliar o efeito da suplementação de ômega-3 e zinco para verificar a melhora do perfil metabólico e neuroinflamatório em ratos obesos.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

O objetivo principal do projeto é avaliar o efeito da suplementação de ômega-3 ou zinco sobre parâmetros metabólicos e neuroinflamatórios em ratos submetidos a uma dieta hiperlipídica.

7) FINALIDADE DO PROJETO:

☐ Ensino

☒ Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título ☒ Adequado ☐ Comentários

Introdução ☒ Adequada ☐ Comentários

Objetivos ☒ Adequados ☐ Comentários

Relevância e Justificativa ☒ Adequados ☐ Comentários

Materiais e Métodos ☒ Adequados ☐ Comentários

Cronograma para execução da pesquisa ☒ Adequado ☐ Comentários

Orçamento e fonte financiadora ☒ Adequados ☐ Comentários

Referências Bibliográficas ☒ Adequadas ☐ Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

☒ Sim ☐ Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B | C ☐ D ☐ E ☐

Justifique:

Espécie:

Número Amostral:

Redução Amostral:

☐ Sim ☒ Não

Justifique:

Substituição de Metodologia:

☐ Sim ☒ Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia: ☐ Sim ☒ Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais: ☒ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais: ☒ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável): ☒ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Anestesia dos animais (se aplicável): ☒ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): ☒ Adequada ☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Biotério/Labotatório):

Outra instituição. Qual? Biotério/UFCSPA

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
------	---------	------	------------

12) RECOMENDAÇÃO: As pendências deverão ser respondidas em uma carta, indicando as páginas do projeto que foram alteradas (nova versão), assinadas pelo pesquisador responsável.

☒ Aprovado

☐ Com Pendência

☐ Não aprovado

Data de início 06/2018.

Data de Término 01/2021.

Comentários gerais sobre o projeto:

Todas as considerações foram atendidas desta forma o projeto foi aprovado.



Samia Squizani

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/9417540364012589>

ID Lattes: **9417540364012589**

Última atualização do currículo em 22/05/2022

Farmacêutica (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2017) e Nutricionista (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2019). Mestranda em Biociências pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) e pós-graduanda pela PUCRS. Principais linhas de pesquisa científica: estudo dos mecanismos fisiopatológicos da obesidade e suas repercussões, com foco principal nos impactos sobre o eixo intestino-cérebro e neuroinflamação (UFCSPA). Principais áreas de experiência: neurociências e reparação de DNA. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome

Samia Squizani 

Nome em citações bibliográficas

SQUIZANI, S.

Lattes iD

 <http://lattes.cnpq.br/9417540364012589>

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2020

Mestrado em andamento em BIOCÊNCIAS (Conceito CAPES 4).
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

Título: Avaliação da Influência da Suplementação de Zinco Sobre o Eixo Intestino-Cérebro de Ratos Obesos.

Orientador:  Renata Padilha Guedes.

Bolsista do(a): Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

2022

Especialização em andamento em Pós-Graduação em Nutrição, Alimentação Saudável e Empreendedorismo. (Carga Horária: 363h).

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.

2017 - 2019

Graduação em Nutrição.

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.

2013 - 2017

Graduação em Farmácia.

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.

2001 - 2012

Ensino Médio (2º grau).

Colégio Marista Santo Ângelo, CMSA, Brasil.

Formação Complementar

2020 - 2022	Formação em Modulação Intestinal. (Carga horária: 80h). Portal Murilo Pereira, -, Brasil.
2020 - 2020	Minicurso - How to write a review paper. (Carga horária: 2h). Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
2020 - 2020	Minicurso - Transforme sua pesquisa com Illumina Next Generation Sequencing. (Carga horária: 2h). Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
2020 - 2020	Pilares da Fitoterapia Funcional. (Carga horária: 1h). VP Centro de Nutrição Funcional, VP, Brasil.
2020 - 2020	Curso de Biossegurança e Pesquisa em Tempos da COVID-19. (Carga horária: 2h). Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
2020 - 2020	Pilares da Nutrição Esportiva Funcional. (Carga horária: 1h). VP Centro de Nutrição Funcional, VP, Brasil.
2019 - 2020	Treinamento teórico prático: Revisão de Literatura. (Carga horária: 40h). InnVitro Pesquisa e Desenvolvimento Ltda., INNVITRO, Brasil.
2019 - 2019	Curso de Saúde Intestinal - Microbioma, alimentos fermentados e kombucha. (Carga horária: 3h). Clínica Frutacor, FRUTACOR, Brasil.
2019 - 2019	Curso de Boas Práticas em Serviços de Alimentação. (Carga horária: 12h). Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, Brasil.
2019 - 2019	Pilares da Nutrição Funcional. (Carga horária: 1h). VP Centro de Nutrição Funcional, VP, Brasil.
2019 - 2019	Pilares da Genômica Nutricional. (Carga horária: 1h). VP Centro de Nutrição Funcional, VP, Brasil.
2017 - 2017	Introdução à Política Nacional de Alimentação e Nutrição. (Carga horária: 30h). Rede de Alimentação e Nutrição do Sistema Único de Saúde, REDENUTRI, Brasil.
2017 - 2017	XXIII Escola de Verão de Química Farmacêutica e Medicinal. (Carga horária: 20h). Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.
2016 - 2016	XXV Curso de Verão em Fisiologia e Farmacologia. (Carga horária: 80h). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.
2014 - 2014	Cuidados manejo de animais de experimentação. (Carga horária: 24h). Fundação Irmão José Otão, FIJO, Brasil.
2014 - 2014	Monitoria de Biofísica. (Carga horária: 80h). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.
2002 - 2011	Escola de Idiomas. (Carga horária: 600h). Kingsway, KINGSWAY, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Vínculo institucional

2015 - 2018 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação científica, Carga horária: 20

Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital São Lucas da PUCRS, IPB/ PUCRS, Brasil.

Vínculo institucional

2014 - 2015 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação científica, Carga horária: 20

Suplan Suplementos Alimentares, SUPLAN, Brasil.

Vínculo institucional

2015 - 2015 Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 20
Outras informações Estagiária de Farmácia na indústria Suplan Suplementos Alimentares, com atuação na área de Controle de Qualidade Físico-Químico e Microbiológico.

Hospital São Lucas da PUCRS, HSL, Brasil.

Vínculo institucional**2018 - 2018****Outras informações**

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 30
Estagiária de Nutrição no Hospital São Lucas (HSL) da PUCRS, com atuação no
Setor de Nutrição Pediátrica.

Vínculo institucional**2015 - 2015****Outras informações**

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 30
Estagiária de Farmácia no Hospital São Lucas (HSL) da PUCRS, com atuação na
área de análises clínicas no Setor de Imunologia e Bioquímica.

Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, FEPPS, Brasil.**Vínculo institucional****2016 - 2016****Outras informações**

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 30
Estagiária de Farmácia na Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
(FEPPS), com atuação na área de Controle Microbiológico de Alimentos.

Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul, INSCER, Brasil.**Vínculo institucional****2017 - 2017****Outras informações**

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 30
Estagiária de Farmácia no Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (InsCer), com
atuação na área de Produção, Controle de Qualidade Físico-Químico e
Microbiológico e Garantia de Qualidade dos Radiofármacos. Além disso, participação
no Centro de Pesquisa Pré-Clínico do InsCer.

Instituto do Câncer Infantil do Rio Grande do Sul, ICI, Brasil.**Vínculo institucional****2019 - 2019****Outras informações**

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 25
Estagiária de Nutrição no Instituto de Câncer Infantil (ICI), com atuação em na
área de Nutrição na Saúde Coletiva.

InnVitro Pesquisa e Desenvolvimento Ltda., INNVITRO, Brasil.**Vínculo institucional****2019 - 2020****Outras informações**

Vínculo: Consultora científica, Enquadramento Funcional: Consultora Convidada
Revisão Bibliográfica de dados toxicológicos para cálculo de PDE.

Vínculo institucional**2019 - 2019****Outras informações**

Vínculo: Consultora científica, Enquadramento Funcional: Consultora Convidada
Revisão de planos de estudo, resultados e relatórios finais de ensaios biológicos,
elaboração de pareceres e de relatórios de discussão científica.

Áreas de atuação

- | | |
|----|---|
| 1. | Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia. |
| 2. | Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição. |
| 3. | Grande área: Ciências Biológicas / Área: Fisiologia / Subárea: Neurociências. |
| 4. | Grande área: Ciências da Saúde / Área: Nutrição / Subárea: Obesidade. |

Idiomas**Inglês**

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Português

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Prêmios e títulos

2017	Prêmio Mérito Estudantil, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).
2017	Prêmio Mérito Acadêmico, Conselho Regional de Farmácias do RS (CRF-RS).

Produções

Produção bibliográfica

Resumos publicados em anais de congressos

1. OLIVEIRA, T. V. ; **SQUIZANI, S.** ; MENZ, M. L. ; OLIVEIRA, I. M. ; MOURA, S. ; DUMAS, F. ; HENRIQUES, J. A. P. ; MACHADO, M. S. . DNA STRAND BREAKS AND MUTAGENICITY INDUCTION BY VALPROIC ACID-DERIVED CUPPER COMPOUNDS IN MAMMALIAN V79 CELLS. In: II LATIN AMERICAN CONGRESS OF CLINICAL AND LABORATORIAL TOXICOLOGY - TOXI LATIN, 2018, Porto Alegre. MODERN TOXICOLOGY FOR HEALTH AND PREVENTION, 2018.
2. **SQUIZANI, S.**; PITREZ, P. M. C. . Análise de Carbono Preto no Escarro Induzido de Motobóis em Região Metropolitana do Sul do Brasil. In: XV Salão de Iniciação Científica da PUCRS, 2014, Porto Alegre. Anais XV Salão de Iniciação Científica da PUCRS, 2014.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. II South Brazilian Symposium on Neuroscience. 2021. (Simpósio).
2. VI Encontro PPG Biociências (PPGBio) da UFCSPA. Influência da Suplementação de Zinco Sobre o Eixo Intestino-Cérebro de Ratos Obesos. 2021. (Encontro).
3. Congresso Nacional de Nutrição - CONANUTRI. 2020. (Congresso).
4. V Biosciences Meeting - Crossing Borders, PPGBio - UFCSPA. Influência da Suplementação de Zinco Sobre o Eixo Intestino-Cérebro de Ratos Obesos. 2020. (Outra).
5. Workshop Microbioma Humano e Aplicações Clínicas - Qiagen. 2020. (Outra).
6. 2º Congresso Sul Brasileiro de Nutrição Funcional. 2019. (Congresso).
7. 2º Congresso Nacional da Alimentação Natural. 2018. (Congresso).
8. XXVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS.. Avaliação da Influência do Silenciamento do Gene AAG na Viabilidade Celular de Linhagens Celulares de Glioblastoma Frente ao Agente Alquilante Metilmetanossulfonato.. 2016. (Exposição).
9. Hot Topics Doenças Respiratórias Pediátricas. 2015. (Simpósio).
10. XVI Salão de Iniciação Científica da PUCRS. Análise de Carbono Preto no Escarro Induzido de Motobóis em Região Metropolitana do Sul do Brasil. 2015. (Exposição).
11. Mesa-Redonda Peticionamento eletrônico (RDC 4/14) da 3ª Semana do Farmacêutico. 2014. (Outra).
12. Projeto Farmacêutico na Praça. Projeto Farmacêutico na praça. Conselho Regional de Farmácia do Rio Grande do Sul (CRFRS).. 2014. (Oficina).
13. XV Salão de Iniciação Científica da PUCRS. Análise de Carbono Preto no Escarro Induzido de Motobóis em Região Metropolitana do Sul do Brasil. 2014. (Outra).