



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro Biomédico**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**Fernanda de Azevedo Marques Lopes**

**Correlação entre epitélio duodenal, marcadores inflamatórios, fibrose hepática e microbiota intestinal em pacientes com diferentes graus de tolerância à glicose e adiposidade corporal**

Rio de Janeiro

2018

Fernanda de Azevedo Marques Lopes

**Correlação entre epitélio duodenal, marcadores inflamatórios, fibrose hepática e microbiota intestinal em pacientes com diferentes graus de tolerância à glicose e adiposidade corporal**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Guilherme Kraemer de Aguiar

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

L864 Lopes, Fernanda de Azevedo Marques.

Correlação entre o epitélio duodenal, marcadores inflamatórios, fibrose hepática e microbiota intestinal em pacientes com diferentes graus de tolerância à glicose e adiposidade corporal / Fernanda de Azevedo Marques Lopes. – 2018.  
179 f.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Guilherme Kraemer de Aguiar

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Obesidade – Teses. 2. Micobiota - Teses. 3. Resistência à insulina - Teses. 4. Cirrose hepática – Teses. 5. Adiposidade - Teses. 6. Mediadores de inflamação. 7. Biomarcadores. I. Aguiar, Luiz Guilherme Kraemer de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616-056.52

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira - CRB7/5302

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Fernanda de Azevedo Marques Lopes

**Correlação entre epitélio duodenal, marcadores inflamatórios, fibrose hepática e microbiota intestinal em pacientes com diferentes graus de tolerância à glicose e adiposidade corporal**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de junho de 2018.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Luiz Guilherme Kraemer de Aguiar (Orientador)  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

---

Prof. Dra. Renata de Mello Perez  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dra. Ana Beatriz Winter Tavares  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

---

Prof. Dr. Heitor Siffert Pereira de Souza  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. Wille Oigman  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Rio de Janeiro

2018

## DEDICATÓRIA

A Deus, que com sua infinita sabedoria, foi meu guia nessa trajetória. Ao meu esposo, Vicente, meu amor, companheiro em todos os momentos desta longa jornada. Ao meu filho querido, João, que renovou a minha fé e me fez seguir em frente. Aos meus pais, Maria Regina e José (*in memoriam*), meus maiores incentivadores desde sempre.

Amo vocês.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela presença constante em minha vida e por nunca me desamparar nos momentos difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Guilherme Kraemer de Aguiar, que me guiou com presteza e dedicação durante a execução deste trabalho. Além de transmitir seus conhecimentos e experiências, foi firme e me fortaleceu, mesmo enfrentando um período tão crítico da nossa instituição. Além de um excelente pesquisador, é um ser humano admirável. Nunca poderei agradecer tamanha generosidade.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Teresa Pugas Carvalho, minha mestre de longa data, que é um exemplo para mim. Esteve presente nas minhas escolhas iniciais e é sempre a minha referência na medicina e na vida.

Ao Prof. Dr. Carlos Terra, ao Prof. Dr. Rodolpho Albano e ao Dr. Davy Raposo, pelo acolhimento, competência e execução de parte das nossas análises.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Eliete Bouskela, que apostou na nossa hipótese e se dispôs a nos ajudar, nos fornecendo toda a estrutura necessária.

À equipe do Biovasc, sem a qual seria impossível a concretização desse trabalho: Dra. Maria das Graças Souza, Dra. Raquel Castiglione, Dra. Carolina Barbosa, Maria Aparecida (“Cida”) e Luciane Vasconcelos (coleta, processamento e análise laboratorial); Dra. Priscila Alves Maranhão (avaliação técnica); agradeço ainda à Eliza Cândido Freitas, pela amizade de sempre.

À secretária do Fisclinux Andreia, que encurtou a distância Rio de Janeiro – Barra Mansa, com toda a sua boa vontade, me atendendo de forma cordial e solidária.

À amiga Vera Regina Mendonça, gerente de saúde da Associação de Aposentados e Pensionistas de Volta Redonda, que foi incansável na árdua tarefa de conciliar os meus deveres profissionais com a rotina de estudos inerentes à execução desta obra, assim como pelo carinho e apoio constantes.

À UERJ, minha amada instituição, a quem devo simplesmente toda a minha formação médica. Não poderia ter escolhido outro local para iniciar a vida acadêmica e espero sempre representá-la de forma positiva para a sociedade.

Ao meu esposo, Vicente Lopes, meu maior incentivador e o principal responsável por eu ter iniciado esse projeto, pelo amor, paciência, companheirismo e cumplicidade. Estar ao seu lado torna o caminhar mais leve e bonito.

Ao meu filho João, recém chegado, que trouxe um sopro de vida no momento de profunda tristeza na nossa família. Espero que um dia, ao ler essa tese, ele se sinta orgulhoso e motivado a nunca desistir dos seus sonhos.

Aos meus irmãos Cláudia e José Eduardo, assim como todos os meus familiares, que foram testemunhas do meu empenho e dedicação, pelo apoio incondicional.

Aos meus Pais, Maria Regina e José (*in memoriam*), que construíram uma base sólida, pautada no amor, para que eu chegasse até aqui. Mãe, obrigada por tudo. Pai, receba o meu abraço: nós conseguimos.

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.

*Arthur Schopenhauer*

## RESUMO

LOPES, Fernanda de Azevedo Marques. *Correlação entre o epitélio duodenal, marcadores inflamatórios, fibrose hepática e microbiota intestinal em pacientes com diferentes graus de tolerância à glicose e adiposidade corporal*. 2018. 179 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Ainda é pouco conhecido o papel da microbiota intestinal (MI) e sua relação com determinadas comorbidades em estudos clínicos. Parece-nos bastante promissor supor que a disregulação da MI, associada às alterações morfofuncionais do epitélio intestinal e consequente maior permeabilidade da mucosa ao LPS (lipopolissacarídeo), deflagraria o gatilho necessário ao estabelecimento da inflamação sistêmica de baixo grau intimamente associada à resistência insulínica e ao fenótipo inflamatório do obeso. Neste estudo transversal, investigamos as associações entre marcadores séricos inflamatórios, morfofuncionalidade e microbiota intestinais e o grau de esteatose/fibrose hepáticas em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose e de adiposidade corporal. Quarenta e seis indivíduos com índice de massa corporal entre 20 e 40 kg/m<sup>2</sup>, disglucêmicos ou não, foram distribuídos nos grupos controle (C), obeso (OB) e obeso com diabetes (OBD). Avaliamos o perfil inflamatório e bioquímico através de dosagens séricas, que foram realizadas nos tempos basal, 30 e 60 minutos após ingestão de refeição padrão. As amostras do epitélio intestinal foram coletadas por meio de biópsias duodenais na endoscopia digestiva alta, tendo sido estudadas as expressões proteicas (Western-blot) da miosina, fosfomiosina, relação fosfomiosina: miosina e  $\beta$ -actina, além da análise da vilina (imunohistoquímica) e atividade da fosfatase alcalina intestinal (ensaio enzimático). Para avaliação do grau de fibrose e esteatose hepáticas utilizamos o FibroScan® e, por fim, a análise da microbiota fecal por técnica de PCR (reação em cadeia de polimerase). O LPS se relacionou diretamente com os índices de adiposidade corporal, assim como os demais marcadores inflamatórios (fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), proteína de ligação ao LPS (LBP), interleucina-6 (IL-6) e ferritina. Além disso, houve uma relação inversa do LPS no tempo 60 minutos com a espessura total do epitélio intestinal e altura do vilo. Ainda em relação ao epitélio intestinal, a  $\beta$ -actina foi a proteína estrutural com maior relevância, sendo inversamente relacionada ao IMC, aos marcadores de resistência insulínica, às provas de função hepáticas e aos índices de elastografia. A fosfatase alcalina intestinal (FAI) seguiu padrão semelhante, também sendo inversamente relacionada à glicose, hemoglobina glicada e gamaglutamil transferase. A microbiota intestinal apresentou grande variabilidade individual, não sendo possível correlacionar qualquer filo à parâmetros específicos no presente estudo. Na comparação entre os grupos, não observamos diferenças entre o LPS, proteínas estruturais, análises histomorfométricas e microbiota intestinal. A atividade da FAI foi maior no grupo C, comparado ao OBD, sendo o oposto dos índices de fibrose e esteatose hepáticas, mais significantes no grupo OBD, conforme esperado. De forma importante, demonstramos que a fosfatase alcalina intestinal se encontra mais ativa em indivíduos magros, em comparação aos obesos. Além disso, encontramos associações entre esta e os marcadores de resistência insulínica. Observamos também o provável papel protetor da  $\beta$ -actina e a relação entre determinadas variáveis histomorfométricas e o LPS. Por fim, os objetivos principais desta pesquisa foram concluídos, pois conseguimos comprovar que existem associações entre os parâmetros estudados e constatamos que o epitélio intestinal pode estar alterado no fenótipo inflamatório presente na obesidade e na disglucemia, independente do perfil microbiano intestinal. Tais dados merecem ser investigados futuramente, a fim de permitir melhor entendimento na fisiopatologia da obesidade e de algumas de suas comorbidades.

Palavras - chave: Obesidade, Microbiota, Permeabilidade Intestinal, DHGNA

## ABSTRACT

LOPES, Fernanda de Azevedo Marques. *Correlation between duodenal epithelium, inflammatory markers, liver fibrosis and intestinal microbiota in patients with different degrees of glucose tolerance and body adiposity*. . 2018. 179 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

The role of the intestinal microbiota (MI) and its relationship to certain comorbidities in clinical studies is still poorly understood. It seems promising to us that the dysregulation of MI, associated with morphofunctional changes in the intestinal epithelium and consequent increased mucosal permeability to LPS (lipopolysaccharide), would trigger the necessary trigger for the establishment of low-grade systemic inflammation closely associated with insulin resistance and inflammatory phenotype of the obese. In this cross-sectional study we investigated the associations between inflammatory serum markers, morphofunctionality and intestinal microbiota and the degree of hepatic steatosis / fibrosis in individuals with different degrees of glucose tolerance and body adiposity. Forty-six individuals with a body mass index between 20 and 40 kg / m<sup>2</sup>, dysglycemic or not, were distributed in the control (C), obese (OB) and obese (OBD) groups. We evaluated the inflammatory and biochemical profile through serum dosages, which were performed at baseline, 30 and 60 minutes after standard meal intake. The intestinal epithelial samples were collected by means of duodenal biopsies in upper digestive endoscopy. The myosin, phosphomyosin, phosphosiosine, myosin and  $\beta$ -actin protein expression (Western blot) and myelin (immunohistochemistry) and intestinal alkaline phosphatase activity (enzyme assay). In order to evaluate the degree of hepatic fibrosis and steatosis, we used FibroScan® and, finally, fecal microbiota analysis by PCR (polymerase chain reaction). LPS was directly related to body fat index, as well as other inflammatory markers (tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), LPS binding protein (LBP), interleukin-6 (IL-6) and ferritin. In addition, there was an inverse relationship of the LPS in the time 60 minutes with the total thickness of the intestinal epithelium and height of the villi. Still in relation to the intestinal epithelium,  $\beta$ -actin was the most important structural protein, being inversely related to BMI, markers of insulin resistance, hepatic function tests and elastography indices. Intestinal alkaline phosphatase (IAF) followed a similar pattern, also being inversely related to glucose, glycated hemoglobin and gamma globulin transferase. The intestinal microbiota presented great individual variability and it was not possible to correlate any phyla to the specific parameters in the present study. In the comparison between the groups, we did not observe differences between LPS, structural proteins, histomorphometric analyzes and intestinal microbiota. The activity of FAI was higher in group C, compared to OBD, being the opposite of hepatic fibrosis and steatosis indexes, more significant in the OBD group, as expected. Importantly, we demonstrated that intestinal alkaline phosphatase is more active in lean individuals compared to obese individuals. In addition, we found direct associations between this and markers of insulin resistance. Opposite to this, we observed the probable protective role of  $\beta$ -actin and the relationship between certain histomorphometric variables and LPS, demonstrating that the intestinal epithelium may be altered in the inflammatory phenotype present in the metabolic syndrome. Finally, the main objectives of this research were concluded, since we could verify that there are associations between the studied parameters and we verified that the intestinal epithelium may be altered in the inflammatory phenotype present in obesity and dysglycemia, independent of the intestinal microbial profile. Such data deserve to be investigated in the future, in order to allow a better understanding of the pathophysiology of obesity and some of its comorbidities.

Keywords: obesity, microbiota, intestinal permeability, DHGNA.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Hipóteses de mecanismos relacionando MI e obesidade.....	27
Figura 2 - Microbiota e metanogênese .....	28
Figura 3 - Microbiota intestinal afetando o metabolismo lipídico.....	31
Figura 4 - Sistema endocanabinóide e a regulação da adipogênese, via LPS .....	32
Figura 5 - Sinalização do lipopolissacarídeo (LPS) via fator nuclear kappa B (NF-κB).....	34
Figura 6 - Barreira epitelial intestinal: vias de permeação não-mediadas.....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação de Obesidade de acordo com o Índice de Massa Corpórea (IMC)...	21
Tabela 2 - Critérios para o diagnóstico de Síndrome Metabólica (ATP III, 2001) .....	22
Tabela 3 - Composição da microbiota intestinal de humanos obesos e sobrepeso em relação a indivíduos controles .....	26
Tabela 4 - Resumo dos estudos de permeabilidade intestinal em humanos .....	37
Tabela 5 - Resumo dos principais estudos sobre disbiose intestinal e DHGNA.....	49
Tabela 6 – Critérios Diagnósticos para Diabetes Mellitus .....	54
Tabela 7 - Etapas do Estudo .....	57
Tabela 8 - Limitações do CAP na elastografia hepática transitória .....	73
Tabela 9 - Características clínicas e bioquímicas dos participantes na fase de recrutamento e dosagens basais .....	78
Tabela 10 - Questionário de frequência alimentar.....	79
Tabela 11 - Comparação das dosagens bioquímicas <u>entre os grupos</u> .....	80
Tabela 12 - Análise comparativa da AUC das variáveis bioquímicas <u>entre os grupos</u> .....	81
Tabela 13 - Análise comparativa dos interceptos das variáveis bioquímicas <u>entre os grupos</u> .	81
Tabela 14 - Análise comparativa do <i>slope</i> das variáveis bioquímicas <u>entre os grupos</u> .....	81
Tabela 15 - Análise comparativa das variáveis bioquímicas <u>dentro do mesmo grupo</u> .....	82
Tabela 16 - Análise das proteínas expressas no epitélio duodenal <u>entre os grupos</u> .....	83
Tabela 17 - Análise enzimática .....	83
Tabela 18 - Análise histomorfométrica .....	85
Tabela 19 - Análise FibroScan® <u>entre os grupos</u> .....	85
Tabela 20 - Comparação da abundância de Otus entre os grupos especificados .....	87
Tabela 21- Correlações de marcadores séricos inflamatórios com antropometria e bioquímica nos indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose.....	88
Tabela 22 - Correlações das proteínas estruturais em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose .....	91
Tabela 23 - Correlações da fosfatase alcalina intestinal com variáveis bioquímicas em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose .....	93
Tabela 24 - Correlações entre histomorfometria do epitélio intestinal e variáveis clínicas e laboratoriais em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose .....	94

Tabela 25 - Correlação entre as variáveis antropométricas e bioquímicas com a elastografia em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose .....	96
Tabela 26 - Correlação entre as variáveis bioquímicas com a elastografia em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose .....	96
Tabela 27 - Correlação entre as variáveis epiteliais com a elastografia em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose .....	99
Tabela 28 - Correlação entre a microbiota intestinal e índices antropométricos em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose .....	100
Tabela 29 - Correlação entre a microbiota intestinal e metabolismo da glicose em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose .....	100
Tabela 30 - Correlação entre a microbiota intestinal e as provas de função hepáticas em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose .....	101
Tabela 31- Correlação entre a microbiota intestinal e o LPS/LBP em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose .....	101
Tabela 32 - Correlação entre a microbiota intestinal e marcadores inflamatórios em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose .....	102
Tabela 33 - Correlação entre a microbiota intestinal e marcadores hormonais em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose .....	103
Tabela 34 - Correlação entre a microbiota intestinal e epitélio intestinal em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose .....	104
Tabela 35 - Correlação entre a microbiota intestinal e elastografia em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose .....	104

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	Do inglês, <i>American Diabetes Association</i>
ADP	Difosfato de adenosina
AG	Ácidos graxos
AMP	Monofosfato de adenosina
AGL	Ácidos graxos livres
ATP	Trifosfato de adenosina
ATP III	Adult Treatment Panel III
BIOVASC	Laboratório de Pesquisas em Biologia Vascular
CA	circunferência abdominal
CAP	Parâmetro de atenuação controlada
ChREBP	Proteína de ligação do elemento de resposta sensível a carboidratos
C	Controle
CS	Coleta de sangue
CB1	Receptor endocanabinóide 1
CB2	Receptor endocanabinóide 2
Cr51-EDTA	Cromo-51 ácido etilenodiaminotetracético
CT	Colesterol total
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DII	Doença inflamatória intestinal
DNAr	DNA ribossômico ou ribossomal
DNAr 16S	Subunidade 16S do DNAr
DNAr 18S	Subunidade 18S do DNAr
eCB	Endocanabinóides (ligantes dos receptores canabinóides)
ELISA	Do inglês, <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FAI	Fosfatase alcalina intestinal
FIAF	Fator adiposo induzido pelo jejum
FL	Fosfolipídeos
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GIP	Peptídeo insulinotrópico glicose-dependente
GLP-1	Peptídeo glucagon-símile 1

GPR41	Receptor acoplado à proteína G 41
HDL	Lipoproteína de alta densidade
H <sub>2</sub>	Hidrogênio
IBRAG	Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
IFN	Interferon
IHQ	Imunohistoquímica
IκB	Inibidor κB
IKK	Complexo IκB cinase
IL-1	Interleucina-1
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de Massa Corporal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
INF-γ	Interferon-gamma
IQR	Intervalo interquartil
IRAK	Cinase do receptor de interleucina
IRS-1	Substrato do receptor de insulina 1
IRS-2	Substrato do receptor de insulina 2
IT-MMP	Inibidor de tecido de metaloproteinase-1
LABLIP	Laboratório de Lípidos
LBP	Proteína de ligação ao LPS
LDA	Discriminante linear do tamanho
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LP	Lipoproteínas
LPL	Lipase lipoproteica
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos tipo 1
MD-2	Proteína mielóide diferenciadora-2
MI	Microbiota intestinal
MYD88	Proteína de resposta à diferenciação mielóide 88
NASH	Esteato-hepatite não alcoólica
NF-κb	Fator nuclear kappa B
NIK	Cinase indutora do NF-κB

NO	Óxido nítrico
OB	Obeso
OBD	Obeso e disglucêmico
OMS	Organização Mundial de Saúde
OTU	Unidade taxonômica operacional
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógeno
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDC	Fosfatidilcolina dietética
PPAR	(Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma)
PPC	Policlínica Piquet Carneiro
PYY	Peptídeo YY
QFA	Questionário de frequência alimentar
QIIME	<i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i>
RBP-4	Proteína ligante do retinol 4
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
RNA <sub>r</sub>	RNA ribossômico ou ribossomal
RNA <sub>r</sub> 16S	Subunidade 16S do RNA <sub>r</sub>
RNA <sub>r</sub> 18S	Subunidade 18S do RNA <sub>r</sub>
RCQ	Relação cintura-quadril
SEC	Sistema Endocanabinóide
SOCS 1 e 3	Proteínas supressoras de sinalização de citocinas 1 e 3
SREBP-1	Proteína de ligação a elemento regulador do esterol 1
TdR	Taxa de sucesso do exame
TG	Triglicerídeos
TGFβ	Fator transformador do crescimento beta
TLR	Receptores tipo Toll
TLR-4	Receptores tipo Toll-4
TMA	Trimetilamina
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
TRAF6	Fator 6 associado ao receptor TNF
WB	<i>Western Blot</i>

ZO

Zônula de oclusão

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\beta$	Beta
$\alpha$	Alfa
%	Porcentagem
<	Menor que
$\gamma$	Gamma
$\kappa$	Kappa
mg	Miligrama
/	Divisão
dL	Decilitro
g	Gramma
cm	Centímetro
kg	Kilograma
=	Igual a
$\times$	Multiplicação
-	Subtração
kcal	Kilocaloria
$\mu\text{M}$	Micromolar
mL	Mililitro
min	Minuto
pM	Picomolar
pg	Picograma
ng	Nanograma
-	Menos (ou Subtração)
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
mm	Milímetro
$\mu\text{L}$	Microlitro
nm	Nanômetro
mM	Milimolar
$\mu\text{UI}$	Microunidades internacionais
mmol	Milimol

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\pm$	Mais ou menos
Hz	Hertz
mmHg	Milímetro de mercúrio
$\Delta$	Delta

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	21
1. OBESIDADE E MICROBIOTA INTESTINAL .....	25
1.1 Extração de energia adicional da dieta .....	28
1.2 Expressão gênica, homeostase energética e modulação do metabolismo .....	29
1.3 Modulação do eixo cérebro-intestinal e do sistema endocanabinóide .....	31
1.4 Indução da inflamação e resistência à insulina .....	33
2. EVIDÊNCIAS – OBESIDADE E EPITÉLIO INTESTINAL .....	35
3. MICROBIOTA E DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCÓOLICA... ..	42
3.1 Microbiota e resistência à insulina, causando danos hepáticos .....	44
3.2 Microbiota e fibrogênese hepática.....	48
3.3 Microbiota e ação independente à síndrome metabólica .....	49
3.4 Estudos conflitantes .....	50
4. JUSTIFICATIVA .....	52
5. OBJETIVOS.....	53
5.1 Primário.....	53
5.2 Secundário .....	53
6. MATERIAL E MÉTODOS .....	54
6.1 Participantes.....	54
6.2 Critérios de inclusão .....	55
6.3 Critérios de exclusão.....	55
6.4 Desenho do estudo.....	56
6.5 Etapas do estudo .....	56
6.5.1 <u>Primeira etapa</u> .....	57
6.5.2 <u>Segunda etapa</u> .....	58
6.5.3 <u>Terceira etapa</u> .....	58
6.6 Métodos laboratoriais.....	59
6.6.1 <u>Metodologia para análise de Biomarcadores por ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)</u> .....	60
6.6.2 <u>Metodologia para análise simultânea de múltiplos analitos (formato magnético)</u> .....	61
6.6.3 <u>Metodologia para análise de GLP-1 por ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>) Quimioluminescente</u> .....	62

6.6.4 <u>Metodologia para determinação da concentração sérica de LPS</u> .....	63
6.6.5 <u>Categorização da glicemia de jejum alterada</u> .....	64
6.7 <u>Métodos de análise bacteriana das fezes</u> .....	64
6.8 <b>Métodos de análise do epitélio intestinal</b> .....	66
6.8.1 <u>Análise histomorfométrica</u> .....	66
6.8.2 <u>Expressão de proteínas no epitélio intestinal por Western-Blot e atividade enzimática</u> .	.67
6.8.3 <u>Expressão proteica por Imuno-Histoquímica</u> .....	68
6.8.4 <u>Método de análise do grau de esteatose e fibrose hepáticas</u> .....	70
<b>7. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	74
<b>8. ASPECTOS ÉTICOS</b> .....	75
<b>9. RESULTADOS</b> .....	76
9.1 <b>Comparações entre os grupos – investigação do objetivo secundário</b> .....	77
9.1.1 <u>Características antropométricas e bioquímicas</u> .....	77
9.1.2 <u>Questionário de frequência alimentar (OFA)</u> .....	79
9.1.3 <u>Análises séricas</u> .....	80
9.1.4 <u>Análises moleculares</u> .....	82
9.1.5 <u>Análises histomorfométricas</u> .....	84
9.1.6 <u>Elastografia hepática</u> .....	85
9.1.7 <u>Microbiota intestinal</u> .....	86
9.2 <b>Correlações – investigação do objetivo primário</b> .....	88
9.2.1 <u>Marcadores séricos inflamatórios</u> .....	88
9.2.2 <u>Correlações do epitélio intestinal</u> .....	91
9.2.3 <u>Correlações da elastografia hepática</u> .....	95
9.2.4 <u>Correlações da microbiota intestinal</u> .....	99
<b>10. DISCUSSÃO</b> .....	105
<b>CONCLUSÃO</b> .....	117
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	118
<b>APÊNDICE A - Obesity, Intestinal Gut Barrier and Microbiota: an Emerging Frontier on Energy Metabolism (Artigo Publicado)</b> .....	138
<b>APÊNDICE B - Obesity and gut microbiota – what do we know so far? (Artigo Publicado)</b> .....	146

<b>APÊNDICE C</b> – Correlation between duodenal epithelium and liver damage in obesity and glucose intolerance independently of intestinal microbiota (Artigo Submetido).....	155
<b>ANEXO A</b> – Coleta de fezes .....	176
<b>ANEXO B</b> – Aprovação do comitê de Ética do HUPE – UERJ .....	177
<b>ANEXO C</b> – Definição das OTUs .....	180

## INTRODUÇÃO

A obesidade tornou-se uma pandemia dos tempos modernos e a previsão é de que sua incidência aumente a cada ano. Segundo dados da última estatística sobre obesidade feita no Brasil (VIGITEL, 2016), a proporção de pessoas acima do peso no Brasil avançou de 42,7%, em 2006, para 53,8%, em 2016. No mesmo período, o percentual de adultos obesos subiu de 11,8% para 18,9% (1).

Embora existam várias maneiras de se medir o estado de adequação entre peso corporal e a estatura, o índice de massa corporal (IMC) continua sendo o mais amplamente utilizado, dado a sua facilidade de execução (Tabela 1). Entretanto, esta medida sofre críticas por não conseguir distinguir acuradamente a massa gorda da magra e, ainda, por não dar informações sobre a distribuição corporal da gordura, informação esta importante, visto que a adiposidade abdominal está associada a um maior risco cardiometabólico, enquanto a periférica parece ter um papel protetor. Além disso, o IMC não indica necessariamente o mesmo grau de gordura em diferentes grupos étnicos devido às proporções corporais (2).

Para tentar minimizar as limitações impostas pelo IMC, podemos utilizar medidas de distribuição corporal de gordura (2). Desta forma, a circunferência abdominal (CA) recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), compreendida como a circunferência abdominal medida no ponto médio entre o rebordo costal e a crista ilíaca com o indivíduo ereto e sem roupas, bem como a relação cintura-quadril (RCQ), aferida no maior diâmetro da região glútea, são empregadas como medidas auxiliares (2).

Tabela 1 – Classificação de Obesidade de acordo com o Índice de Massa Corpórea (IMC)

<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Classificação</b>
<b>&lt; 18,5</b>	Baixo peso
<b>18,5- 24,9</b>	Eutrófico
<b>25,0- 29,9</b>	Sobrepeso
<b>30,0- 34,9</b>	Obesidade grau I
<b>35,0- 39,9</b>	Obesidade grau II
<b>≥ 40,0</b>	Obesidade grau III

Fonte: Mancini, Tratado de Obesidade, 2010 (2)

A associação entre obesidade central e risco cardiovascular pode ser reportada à descrição da obesidade andróide por Jean Vague, em 1947. No entanto, mesmo antes deste período, antropometristas já haviam relatado diferenças entre propensão à doenças e características psicológicas em relação ao hábito corporal. O conceito de obesidade hiperplásica e hipertrófica surgiu algum tempo depois, amparada pela observação de diferenças na prevalência de anormalidade metabólicas entre homens e mulheres com o mesmo grau de obesidade (3). Surgia então o conceito de Síndrome Metabólica (inicialmente chamada de Síndrome X), na qual a hiperinsulinemia e a resistência à insulina são fatores primários em associação com disglícemia, hipertrigliceridemia, baixos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL), hipertensão arterial sistêmica (HAS) e obesidade central (3).

A Síndrome Metabólica pode ser definida segundo os critérios diagnósticos do NCEP-ATP III (*Adult Treatment Panel III*), quando três ou mais dos seguintes critérios estiverem presentes: obesidade abdominal (visceral), correspondente a uma cintura maior que 102 em homens e 88 em mulheres, em cm; glicemia de jejum superior a 110 mg/dL; hipertrigliceridemia maior ou igual a 150 mg/dL; HDL colesterol menor que 40 mg/dL em homens e 50 mg/dL em mulheres, e ainda hipertensão arterial sistêmica em tratamento ou níveis pressóricos superiores a 130/85 mmHg (4). Posteriormente, o ponto de corte para a glicemia foi reduzido para 100 mg/dL (Tabela 2).

Tabela 2 - Critérios para o diagnóstico de Síndrome Metabólica (ATP III, 2001)

<b>Circunferência Abdominal</b>	Homens > 102 cm; Mulheres > 88 cm
<b>Glicemia de jejum*</b>	≥ 110 mg/dL ou uso de medicação
<b>Triglicerídeos</b>	≥ 150 mg/dL ou uso de medicação
<b>HDL</b>	Homens < 40 mg/dL e Mulheres < 50 mg/dL
<b>Pressão Arterial</b>	130/85 mmHg ou uso de medicação

Legenda: \*Atualmente ≥ 100 mg/dL.

Fonte: Lane et al. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 2001 (4).

Em termos de etiologia, podemos afirmar que a obesidade não é proveniente de um único fator, e sim um de um conjunto de condições que resultam no fenótipo obeso. De fato, o

seu desenvolvimento engloba múltiplas causas e é o resultado de complexas interações entre determinantes genéticos, psicológicos, socioeconômicos, culturais e ambientais (5).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a ocorrência da obesidade nos indivíduos reflete a interação entre fatores dietéticos, ambientais e genéticos. Existem, porém, poucas evidências de que algumas populações são mais suscetíveis à obesidade por motivos genéticos, o que reforça serem os fatores alimentares e a atividade física os principais responsáveis pela diferença na prevalência da obesidade em diferentes grupos populacionais (6).

Em termos alimentares, podemos destacar as refeições com alta densidade energética, principalmente constituída de lipídeos, favorecendo o aumento da adiposidade (7). Outro aspecto é quanto a frequência dessa alimentação, já que os indivíduos que consomem maior número de pequenas refeições ao longo do dia apresentam peso relativamente menor do que aqueles que consomem número menor de grandes refeições (5).

Quanto à prática de exercícios físicos, já é consenso que a medida que a sociedade se torna mais desenvolvida e mecanizada, a demanda por atividade física é reduzida, diminuindo o gasto energético diário, sendo considerado um outro fator causador importante da obesidade, em especial no ambiente laboral (6, 8).

Algumas evidências sugerem a atuação de genes no desenvolvimento da obesidade, mas seus mecanismos ainda não estão esclarecidos. Acredita-se que esses fatores possam estar relacionados ao consumo e ao gasto energético. O controle do apetite e o comportamento alimentar também sofrem influência genética. Há indícios de que o componente genético atua sobre o gasto energético, em especial sobre a taxa metabólica basal (8).

Desordens endócrinas podem conduzir à obesidade, porém estas causas representam menos de 1% dos casos de excesso de peso. Distúrbios psicológicos também estão associados ao ganho de peso, como estresse, ansiedade e depressão (5), influenciando principalmente o comportamento alimentar (9).

Os indivíduos obesos e magros diferem não só nas características antropométricas, mas também em muitas outras, como, por exemplo, no *status* de inflamação e no predomínio de determinados filos de bactérias intestinais. A obesidade é um estado de inflamação sistêmica crônica subclínica e a microbiota intestinal (MI) tem sido relacionada, em estudos experimentais e observacionais, com a etiopatogenia da obesidade (10-12). A observação de que, quando uma mesma população é submetida a determinado estresse nutricional, alguns indivíduos são menos suscetíveis ao ganho de peso induzido pela dieta e à hiperglicemia,

sugere que outros mecanismos não diretamente relacionados ao genoma humano estejam envolvidos (12).

A obesidade está relacionada a um baixo grau de inflamação crônica, caracterizada pelo aumento local e sistêmico de citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda (13). A ativação do sistema imune pela obesidade desempenha um papel no desenvolvimento do diabetes melittus tipo 2 e da síndrome metabólica, dentre outras doenças relacionadas ao aumento da resistência insulínica (14, 15).

## 1. OBESIDADE E MICROBIOTA INTESTINAL

Evidências de que a composição da flora intestinal poderia ser diferente em indivíduos magros e obesos, amparada pela observação de que obesos apresentavam maior população de *Firmicutes* em relação àquela de *Bacteroidetes*, quando comparados a indivíduos magros, sugeriu a hipótese que relaciona MI à obesidade (12, 16).

Porém, esclarecer se essas diferenças são a causa ou a consequência da obesidade parece ser o maior desafio dos pesquisadores nos dias atuais, assim como entender quais os mecanismos envolvidos neste processo.

A partir da observação inicial de que a flora intestinal poderia ser diferente entre obesos e magros, muitos outros trabalhos foram surgindo, tanto em animais quanto em humanos, confirmando tais resultados (17). No entanto, a definição da alteração da microbiota intestinal de obesos permanece controversa na literatura, tanto no que se refere à abordagem em nível de filo, quanto de espécies.

Na tabela 3, é possível observar que as principais alterações detectadas na composição da MI de humanos obesos e com sobrepeso diferem entre os estudos, possivelmente em função da utilização de técnicas de análises diferentes e do perfil apresentado pelos indivíduos estudados.

Embora os resultados dos estudos identifiquem diferenças na proporção de grupos bacterianos entre indivíduos magros e obesos, ainda não se sabe se algum grupo de microorganismo em especial contribui, de maneira direta, para o desenvolvimento de obesidade e alterações metabólicas (18).

Tabela 3 - Composição da microbiota intestinal de humanos obesos e sobrepeso em relação a indivíduos controles

Referência	Grupos bacterianos ou espécies																		
	<i>Eubacteria</i>	<i>Taxa Bacteroides/ Firmicutes</i>	<i>Bacteroidetes</i>			<i>Firmicutes</i>													
			<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Firmicutes</i>	Grupo <i>Clostridium coccooides</i>	<i>Roseburia-Eubacterium rectale</i>	<i>Clostridium leptum</i> group	Subgrupo <i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Grupo <i>Clostridium histolyticum</i>	<i>Eubacterium cylindroides</i>	<i>Veillonella</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Lactobacillus, Lactobacillus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Staphylococcus, Staphylococcus aureus</i>	<i>Veillonella spp.</i>
Armougom <i>et al.</i> , 2009			↓				↑										↑		
Collado <i>et al.</i> , 2008	↔			↑	↔							↔							↑
Duncan <i>et al.</i> , 2008	↔				↔														
Larsen <i>et al.</i> , 2010		↔																	
Ley <i>et al.</i> , 2006		↓	↓				↑												
Malinen <i>et al.</i> , 2010	↔							↔								↔			↔
Santacruz <i>et al.</i> , 2010	↔			↓				↔	↔								↑	↑	
Schwiertz <i>et al.</i> , 2010	↔ ↑		↑	↑		↔	↓	↔	↔	↓	↓		↔	↔			↔		↔
Tihonen <i>et al.</i> , 2010	↔		↔					↔							↔	↔			
Turnbaugh <i>et al.</i> , 2009			↓				↔												
Zhang <i>et al.</i> , 2009			↔			↑													

Legenda: As setas indicam: contagem maior (↑), menor (↓) ou inalterada (↔).

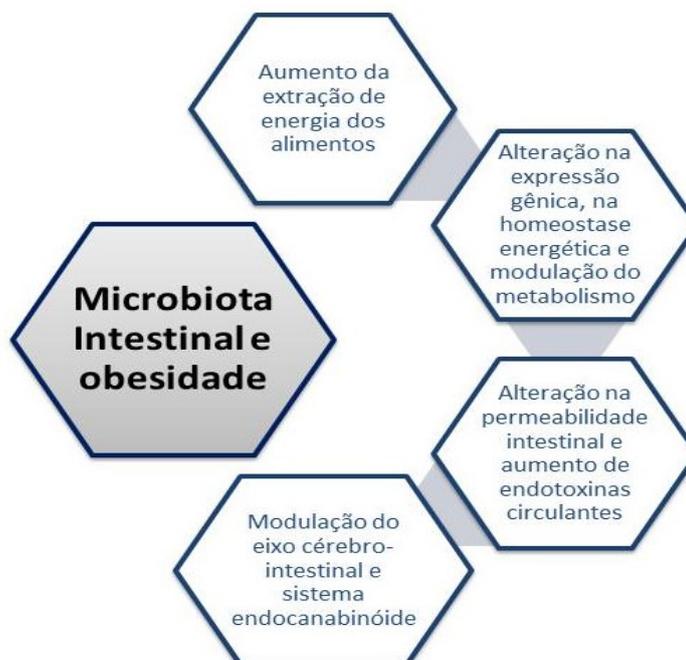
Fonte: Modificado de Lyra et al. Beneficial microbes, 2010 (18).

Um novo horizonte foi aberto para o entendimento e tratamento desta pandemia dos tempos modernos, denominada de obesidade. A descoberta da influência da MI (composta em mais de 90% por espécies de *Bacteroidetes* e *Firmicutes*) na composição corporal revelou-se promissora não somente no que diz respeito à composição corporal, quanto em muitas outras doenças até então pouco compreendidas.

Exemplificando o vasto campo de estudo nesse assunto temos, dentre muitas terapias, o transplante de microbiota fecal, que se mostrou eficaz em pacientes com infecções refratárias por *Clostridium difficile*(19). Esse procedimento também tem sido sugerido como opção de tratamento na doença inflamatória intestinal, dado o papel da MI nesta afecção (20, 21). Vermeire e colegas avaliaram o impacto do transplante fecal em pacientes com doença inflamatória intestinal e estudaram os preditores de resposta clínica em certos tipos de filos bacterianos de doadores e pacientes, tendo concluído que o transplante de microbiota fecal levou a remissão endoscópica a longo prazo (> 2 anos) em 2 dos 8 pacientes com colite ulcerativa (20).

Várias revisões da literatura têm sido publicadas relacionando MI e doenças metabólicas, dentre elas a obesidade. Entre os mecanismos propostos, podemos citar o papel da microbiota em aumentar a extração de energia dos alimentos; efeitos na expressão gênica, na homeostase energética e no metabolismo; modulação do eixo cérebro-intestinal e do sistema endocanabinóide e, por fim, indução da inflamação sistêmica e resistência à insulina, devido à alterações na permeabilidade intestinal e aumento de endotoxinas circulantes, conforme demonstrado na figura 1 (22-26).

Figura 1 - Hipóteses de mecanismos relacionando MI e obesidade

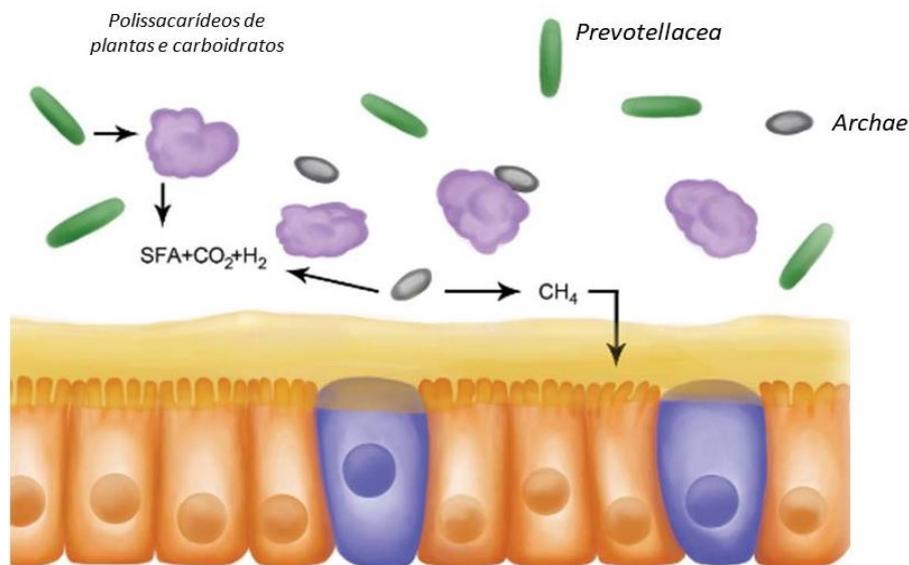


Fonte: A Autora, 2018.

### 1.1 Extração de energia adicional da dieta

Uma das hipóteses centrais para explicar a maior capacidade da microbiota em extrair energia da dieta é a transferência de hidrogênio ( $H_2$ ) entre as espécies bacterianas e *Archaea*. O aumento da metanogênese, pela oxidação do hidrogênio, facilita o processamento de polissacarídeos de plantas e outros carboidratos por fermentadores produtores de  $H_2$ , por exemplo, organismos da família *Prevotellaceae*. A fermentação acelerada estimula a hidrólise de matéria orgânica, geralmente não digerível, e leva à produção de acetato, que pode ser absorvido no intestino e, com isso, utilizado pelo hospedeiro. Foi observado que indivíduos obesos apresentam maior abundância de *Archaea* e *Prevotellaceae*, o que indica que a microbiota do obeso favorece a metanogênese (Figura 2) (27).

Figura 2 - Microbiota e metanogênese



Fonte: Adaptado de Revista da Sociedade de Microbiologia, 2013(27).

Grande parte das evidências de que a microbiota intestinal de obesos favorece a maior extração calórica da dieta é originada a partir de estudos com animais assépticos, do inglês *germ-free*. Em 2004, *Backhed et al* demonstrou que animais *germ-free* apresentavam menor percentual de gordura corporal em comparação a animais convencionalizados (controles), apesar de consumirem uma maior quantidade de dieta (28). Outro grupo evidenciou que a

convencionalização de animais *germ-free* favorece o desenvolvimento da microvasculatura intestinal, por meio da sinalização das bactérias intestinais com células epiteliais específicas (células de Paneth). Esse aumento da capilarização da vilosidade intestinal contribui para a maior absorção de nutrientes (29). Observou-se ainda que a inoculação da microbiota de animal obeso em animais *germ-free* resulta em maior produção de acetato e propionato por grama de conteúdo cecal e maior ganho de gordura corporal, quando comparada à inoculação da microbiota de animal magro. Somado a isso, foi visto que o consumo de dieta ocidental, com alto teor de lipídios e açúcares, a qual é utilizada em modelos animais para induzir o ganho de peso, não promoveu obesidade em animais *germ-free* (30).

Todas essas observações corroboram com a hipótese de que a dieta isoladamente não seria o único fator causal do ganho ponderal em modelos de roedores, já que na ausência da microbiota, o consumo de uma dieta obesogênica não estimulou o desenvolvimento da obesidade.

Porém, existem algumas controvérsias na literatura. O resultado do estudo de *Fleissner et al* não confirmou a ideia de que a ausência de microbiota proteja o animal *germ-free* da obesidade induzida pela dieta (31). Foi demonstrado que o aspecto qualitativo da dieta (perfil de ácidos graxos), mais do que a quantidade de macronutrientes, é o que determina a extensão da proteção ao ganho de peso pelo animal *germ-free* (31). Especula-se que a relação entre a composição da microbiota intestinal e o aumento da extração energética seja mais complexo do que se acreditava anteriormente e pode ser influenciada pela adaptação microbiana à dieta nas diferentes fases da vida (32).

Como podemos observar, a maioria destas questões ainda não está elucidada. Em primeiro lugar, não está claro se pequenas mudanças na extração calórica podem, realmente, ocasionar grandes diferenças no peso corporal. Além disso, é essencial provar se as diferenças observadas na microbiota em indivíduos obesos são a causa ou a consequência da obesidade.

## **1.2 Expressão gênica, homeostase energética e modulação do metabolismo**

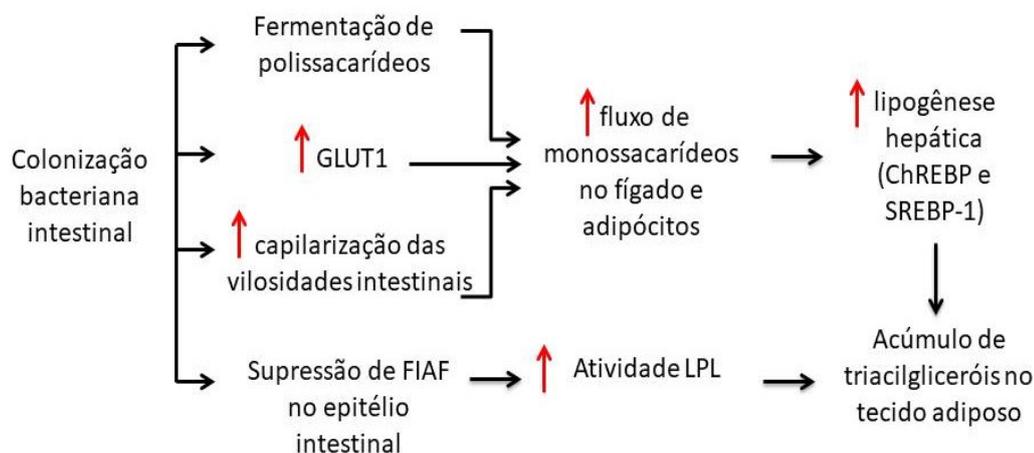
Fígado e músculo esquelético são tecidos periféricos que exercem importante papel na regulação do metabolismo de carboidratos e lipídios. O acúmulo de lipídeos nesses tecidos tem sido relacionado ao desenvolvimento de resistência insulínica, uma das alterações metabólicas associadas à obesidade e diabetes (33, 34). A alteração na atividade metabólica

desses tecidos pode influenciar a glicemia e a sinalização da insulina. A sinalização da insulina é complexa e sofre influência de outros fatores, como a inflamação subclínica e o estresse oxidativo (35). Existem relatos de que a microbiota participe da regulação do metabolismo de carboidratos e lipídios do hospedeiro, e indiretamente da sinalização da insulina, por influenciar a expressão gênica desses órgãos.

A influência no padrão de expressão gênica do músculo e tecido adiposo ocorre de modo indireto, por meio do aporte de produtos finais do metabolismo microbiano. A fermentação de polissacarídeos pela microbiota pode gerar um aumento no fluxo de monossacarídeos para o fígado e adipócitos, favorecendo a lipogênese *de novo*, pela ativação da expressão de dois reguladores nucleares de enzimas lipogênicas - *carbohydrate response element-binding protein (ChREBP)* e *sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1)* - os quais ativam enzimas lipogênicas acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintase. Essas mudanças favorecem o acúmulo de triacilgliceróis no fígado e no tecido adiposo (36).

O menor acúmulo de gordura corporal em animais *germ-free*, que consomem dieta hiperlipídica e apresentam absorção de lipídeos semelhantes ao animal convencionalizado, indica que a microbiota intestinal pode exercer efeitos sobre o fluxo de lipídeos entre os tecidos, reduzindo o acúmulo de gordura. A expressão intestinal da proteína denominada fator adipositário induzido pelo jejum, do inglês *fasting-induced adipose factor (FIAF)* é suprimida pela presença da microbiota. A proteína FIAF inibe a expressão da enzima lipase lipoproteica (LPL) no tecido adiposo, limitando a captação de ácidos graxos e favorecendo o acúmulo de triacilgliceróis nesse tecido. Animais *germ-free* apresentam a maior expressão de FIAF e fenótipo resistente à obesidade (Figura 3) (28).

Figura 3 - Microbiota intestinal afetando o metabolismo lipídico



Fonte: Modificado de Backed et al. Proc Natl Acad Sci, 2010 (28).

### 1.3 Modulação do eixo cérebro-intestinal e do sistema endocanabinóide

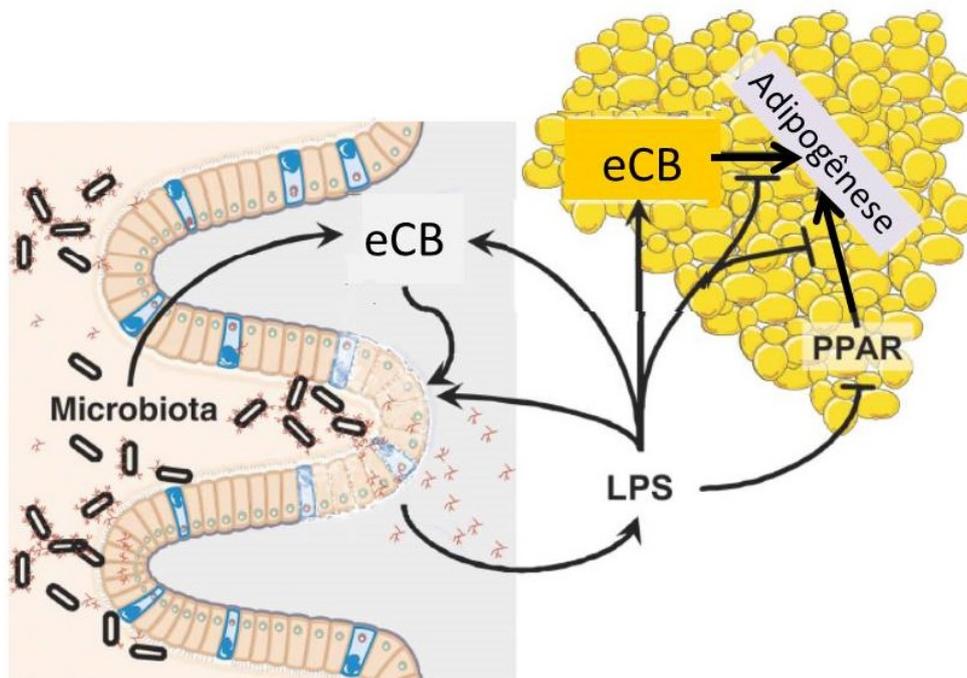
O eixo cérebro-intestinal é um sistema de comunicação neuro-hormonal bidirecional que integra as funções cerebrais e gastrointestinais. O estudo da influência cerebral no conteúdo de microrganismos intestinais e, inversamente, a influência da microbiota intestinal no cérebro e no comportamento pode contribuir para o entendimento de outro mecanismo pelo qual a microbiota interfere no metabolismo. O eixo influencia a homeostase de vários sistemas, como funções gastrointestinais (secreções que podem modificar o ambiente gastrintestinal e influenciar a capacidade de colonização de determinados microrganismos), o apetite e o controle de peso (37).

O neuropeptídeo ácido gama-aminobutírico (GABA) exerce importante papel na regulação do gasto energético e da ingestão alimentar, e pode representar um intermediador da influência da microbiota intestinal no eixo cérebro-intestinal (38).

O sistema endocanabinoide (eCB) é outro importante modulador da ingestão calórica, uma vez que regula expressão ou ação de mediadores anorexígenos e orexígenos em várias áreas do hipotálamo. Obesidade e DM2 estão associados a maior ativação do eCB. O eCB é composto por lipídios endógenos que ativam receptores específicos acoplados a proteína G, denominados CB1 e CB2 (39, 40)

Tem sido evidenciada uma ligação entre a microbiota intestinal e o metabolismo do tecido adiposo via eCB e LPS (Figura 4). A microbiota pode regular a atividade do eCB periférico (intestino e tecido adiposo), que, por sua vez, controla a permeabilidade intestinal e a adipogênese. Assim, a ativação do eCB no intestino pela microbiota aumenta a permeabilidade intestinal e favorece o acesso do lipopolissacarídeo (LPS) à circulação. Esse processo compromete ainda mais a permeabilidade intestinal, além de estimular a síntese dos endocanabinoides no intestino e tecido adiposo. O LPS desregula a adipogênese tanto inibindo o PPAR (Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma), que é um fator de transcrição nuclear envolvido no metabolismo glicídico e lipídico, quanto via eCB. No geral, o comprometimento desses laços regulatórios dentro do cólon e tecido adiposo perpetua o desequilíbrio inicial, levando a um ciclo vicioso (40).

Figura 4 - Sistema endocanabinóide e a regulação da adipogênese, via LPS



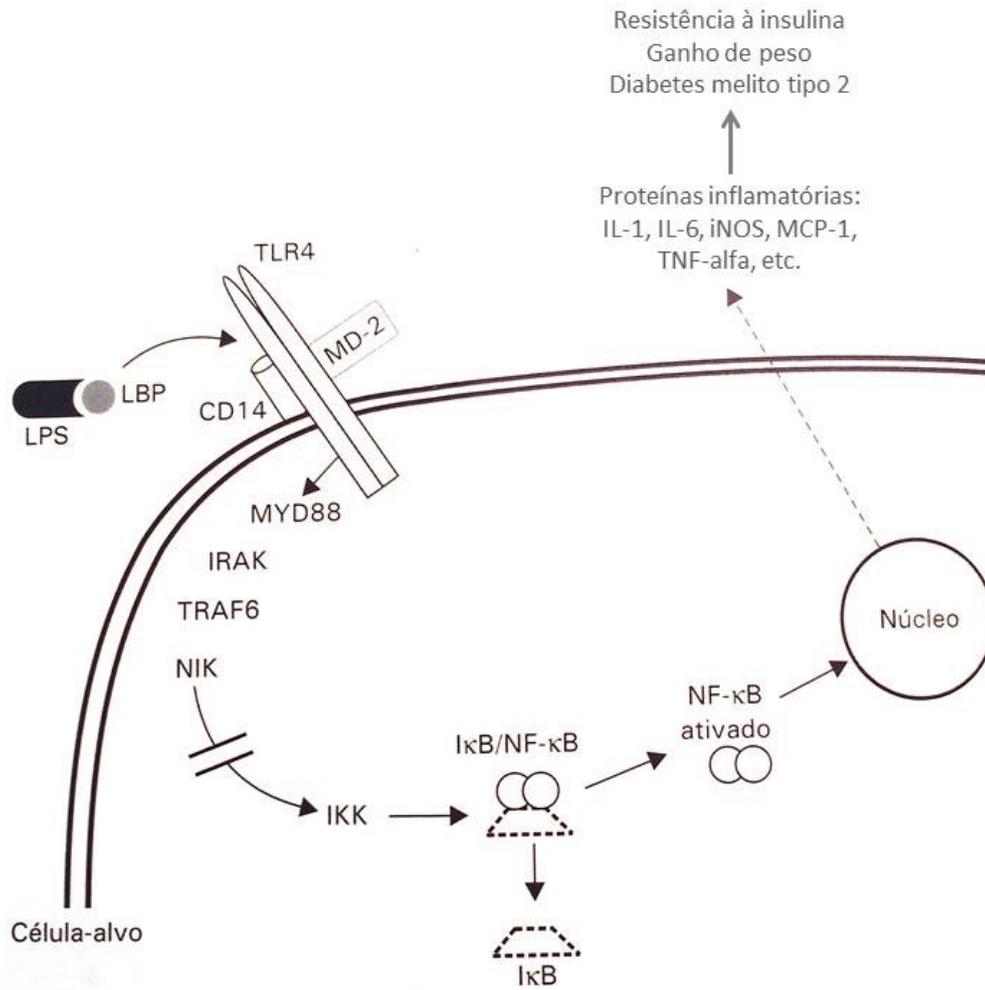
Fonte: Modificado de Muccioli et al. Mol Syst Biol, 2010 (39).

#### 1.4 Indução da inflamação e resistência à insulina

Como descrito anteriormente, a MI desempenha possui um papel importante em condições tais como obesidade, diabetes e síndrome metabólica. O mecanismo pelo qual a MI interfere na homeostase em humanos ainda permanece a ser esclarecido, mas parece que o LPS, presente na membrana externa das bactérias gram-negativas, seria um fator envolvido na disregulação do epitélio intestinal, culminando com aumento da permeabilidade intestinal e, conseqüentemente, potencializando o *status* de inflamação subclínica presente em tais morbidades (41, 42).

A principal via de sinalização do LPS envolve o fator nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) (Figura 5). O LPS pode aumentar os níveis circulantes de resistina, espécies reativas de oxigênio (ERO) e proteínas supressoras da sinalização de citocinas-1 e 3 (SOCS-1 e SOCS-3). A resistina pode ativar o NF- $\kappa$ B e o aumento da produção de ERO ativa várias serinoquinases que comprometem o receptor de insulina. Indica-se que as SOCS-1 e SOCS-3 prejudicam a sinalização da insulina ao inibirem a fosforilação em tirosina dos substratos do receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2) ou mediante o direcionamento de IRS-1 e IRS-2 para degradação proteossômica (43-45). A elevação de citocinas pró-inflamatórias, como interferon-gama (INF- $\gamma$ ), TNF-alfa (do inglês, *tumour necrosis factor*), interleucina (IL)-6 e IL-1 $\beta$ , geralmente observada em obesos e diabéticos, pode ser originada da infiltração de macrófagos no tecido adiposo ou da interação do LPS com o seu receptor. O aumento das citocinas pode contribuir para translocação do LPS, favorecendo a ocorrência de endotoxemia metabólica e, conseqüentemente, potencializar a inflamação subclínica por meio da redução da expressão/distribuição de proteínas formadoras de junções oclusivas (do inglês, *tight junctions*), como a ocludina e a zônula de oclusão-1 (ZO-1), aumentando, com isso, a permeabilidade intestinal (46-48).

Figura 5 - Sinalização do lipopolissacarídeo (LPS) via fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B)



Fonte: Adaptada de Microbiota gastrointestinal: evidências da sua influência na saúde e na doença, 2015 (49).

## 2. EVIDÊNCIAS - OBESIDADE E EPITÉLIO INTESTINAL

O assunto obesidade e intestino remete à pesquisas clínicas antigas, demonstrando que nos primórdios os pesquisadores acreditavam que a obesidade poderia estar direta e meramente relacionada ao comprimento do intestino delgado. Para tentar comprovar essa hipótese, alguns estudos iniciais avaliaram necrópsias de intestinos de obesos e magros, porém os dados foram muito variáveis, na dependência do método empregado e das medidas realizadas (50-53).

O estudo mais relevante desta época foi realizado por *Guzman e colaboradores*, em 1977 (54). Neste, foi medido o comprimento do intestino delgado durante a cirurgia de *bypass* intestinal de 272 obesos mórbidos submetidos à cirurgia jejunoileal, e em 121 pacientes não obesos submetidos à ressecção ileal parcial para hiperlipidemia. Estes autores não observaram diferença significativa no comprimento do intestino entre os pacientes obesos e não obesos. Com o avançar das pesquisas, chegou-se à conclusão que as diferenças entre obesos e magros não estavam relacionadas à extensão do epitélio intestinal em si, e sim às características morfofuncionais específicas que alterariam a estrutura deste epitélio. Os primeiros experimentos neste sentido foram conduzidos em modelos animais.

Como já descrito anteriormente, em 2005, *Ley et al* demonstraram que camundongos obesos possuíam, em sua microbiota, 50% menos *Bacteroidetes* e maior proporção de *Firmicutes*, quando comparados a camundongos magros. Quando estes eram submetidos à dieta para perda de peso, a sua microbiota se tornava muito similar à dos camundongos magros (16). Em um estudo posterior, observou-se um comportamento semelhante em humanos (55). Ainda neste período, *Backhed et al* visualizaram que camundongos convencionais tinham maior quantidade de gordura que camundongos *germ-free*, apesar de uma ingestão calórica 30% menor e um metabolismo de repouso maior, o que evidenciava um papel importante da microbiota no metabolismo energético desses animais (28). Posteriormente, foi demonstrado que a colonização desses camundongos *germ-free* com microbiota de camundongos obesos resultava em um aumento significativo da massa gorda, em comparação a uma colonização feita com a microbiota de camundongos magros (30).

Com o passar do tempo foram sendo sugeridos vários mecanismos para explicar tal relação, dentre os quais, já descritos acima, que a flora intestinal poderia influenciar na capacidade de extração da energia dos alimentos, na regulação de genes do hospedeiro que modulam de que forma a energia é gasta ou armazenada, na modulação dos níveis de LPS

desencadeando uma inflamação crônica subclínica, no tempo de trânsito intestinal e, por fim, na permeabilidade do epitélio intestinal (12, 23, 56).

Existem atualmente fortes evidências de que a flora intestinal tem uma relação estreita com a permeabilidade do epitélio, porém, ainda não se sabe exatamente o mecanismo. Dentre as hipóteses testadas, a mais aceita é o papel do LPS na indução da inflamação crônica e, conseqüentemente, a subseqüente alteração de proteínas juncionais. Só mais recentemente foi sugerido a interação entre o sistema endocanabinoide periférico e a microbiota, no controle da barreira funcional intestinal (39), como descrito anteriormente.

Estudos em animais têm demonstrado alterações morfológicas e aumento da permeabilidade intestinal associadas à obesidade, sem indicar, no entanto, se estas alterações ocorrem no intestino delgado ou no cólon. É sugerido, nestes modelos, que existe uma modificação da expressão de proteínas juncionais deste epitélio, culminando com a maior permeação de endotoxinas, assim como alterações qualitativas e quantitativas das criptas, vilosidades e de enzimas primariamente presentes no epitélio intestinal (46, 57). Esta relação, contudo, ainda precisa ser analisada em humanos.

Um dos assuntos mais estudados neste campo se refere às comparações entre a morfologia intestinal de ratos diabéticos e controles. A hipertrofia e a hiperplasia do intestino delgado têm sido demonstradas nos primeiros, o que poderia influenciar diretamente no grau de absorção dos nutrientes, culminando com o processo fisiopatológico do diabetes (58-61). Além das alterações morfológicas encontradas na maior parte destes estudos em ratos diabéticos, foram também observadas diferenças na expressão das enzimas localizadas na borda em escova dos enterócitos. *Adachi et al* encontraram um aumento expressivo da atividade do complexo sucrase-isomaltase em ratos obesos hiperglicêmicos (62). A sucrase e isomaltase são dissacaridases presentes no intestino delgado e têm um papel importante na fase final da digestão dos carboidratos.

Após essas evidências, *Brun et al* avaliaram ratos obesos comparando-os com controles e demonstraram uma baixa resistência da barreira intestinal, alta endotoxemia portal e altos níveis de citocinas pró-inflamatórias nos primeiros, confirmando a possível ligação entre obesidade e alteração morfofuncional intestinal (63). Posteriormente, estas alterações foram confirmadas, sendo observado que alterações na microbiota intestinal estariam relacionadas a um aumento da permeabilidade e maior absorção do LPS (42, 57). A possível interferência do epitélio intestinal na gênese da disglícemia foi então avaliada em humanos, onde observou-se um aumento de transportadores de monossacarídeos no intestino de diabéticos (64).

A questão da hiperpermeabilidade intestinal na obesidade advém de uma série de análises em roedores (56, 57, 65-67). Existe uma grande dificuldade em avaliar a permeabilidade intestinal em humanos, o que é explicado, em parte, à necessidade de técnicas invasivas, sendo por esse motivo os dados raros e escassos (68). Com o intuito de minimizar este problema, tem se utilizado a administração oral de substâncias absorvidas pela mucosa intestinal, com a sua posterior dosagem urinária. A tabela 4 resume os métodos de medições diretas e indiretas da permeabilidade intestinal em humanos e suas aplicações no contexto da obesidade (68).

Tabela 4 - Resumo dos estudos de permeabilidade intestinal em humanos

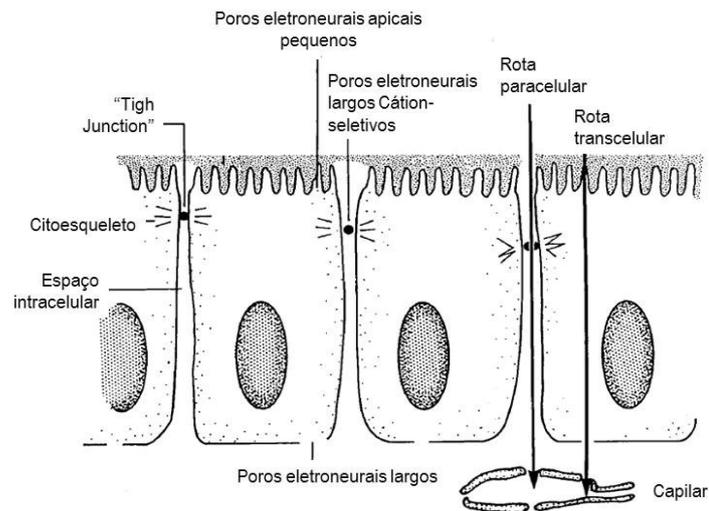
Métodos de medição	Parâmetros utilizados	Segmento estudado	Fonte	Ref
<b>Ex-vivo</b>				
Ussing Chambres	H <sub>2</sub> O, íons, açúcares, etc.			(69)
Expressão de proteínas juncionais	RNA (qPCR), Western blot			(69)
Marcação de células de muco	Histologia	Depende do sitio	Peças operatórias ou biópsias	-
Análise do muco	Histologia / coloração (azul alciano)			-
Avaliação de gaps epiteliais	Histologia. Microscopia eletrônica			-
Perda das células de Paneth	Histologia			-
Expressão de defensinas	RNA (qPCR), Western blot			-
<b>In vivo: Testes de permeabilidade de moléculas</b>				
Oligossacarídeos de pesos moleculares diferentes	Lactulose / manitol (GC-MS)	ID	Urina	
	Lactulose / manitol (GC-MS)	ID	Urina	
	Sucralose / lactulose / manitol (GC-MS)	ID; cólon	Urina	
	Sacarose / lactulose / ramnose / sucralose/ eritritol (GC-MS)	TGI	Urina	
Polietilenoglicóis	PEG 4000/400	TGI	Urina	-
Marcador radioativo	51 Cr-EDTA	TGI	Urina	-
<b>In vivo: Passagem bacteriana</b>				
Endotoxemia	LPS de plasma (LAL)	TGI	Plasma	(70)
	LBP sérico (ELISA)	TGI	Soro	(71)
	LBP sérico (ELISA)	TGI	Soro	(72)
Metabolismo bacteriano	LPS sérico (ELISA-EndoCAb)	TGI	Soro	-
	D-lactato	TGI	Plasma	-
	Produção de butirato	Bactérias produtoras de butirato (PCR)	Cólon	Fezes
Passagem de patógenos	Teste de hemolisina (cultura de células)	Cólon	Fezes	-
Testes respiratórios de H <sub>2</sub>	Quantificação do supercrescimento bacteriano (GC-MS)	TGI	Ar expirado	(41)
<b>In vivo: Biomarcadores de lesão epitelial</b>				
	Citrulina	ID		-
	Zonulina	TGI	Soro	(74)
	Claudina s 3-4	TGI	Urina	-
<b>In vivo: Outro</b>				
Microinflamação intestinal	Calprotectina	Cólon	Fezes	(75, 76)

Legenda: PCR: reação de cadeia de polimerase; ID: intestino delgado; TGI: trato gastrointestinal; LPS: lipopolissacarídeo; LBP: proteína de ligação ao LPS; LAL: ensaio de lisado de amebócitos *Limulus*; EndoCAb: anticorpos do núcleo da endotoxina circulante; CPG: cromatografia na fase gasosa; MS: espectrometria de massa; PEG: polietilenoglicol; EDTA: ácido etilenodiaminotetracético; H<sub>2</sub>: hidrogênio.

Fonte: Adaptada de Genser et al. *Médecine/Sciences*, 2016 (68).

A medida indireta da permeabilidade, através do uso de substâncias orais, compreende o conhecimento do mecanismo de passagem de moléculas do lúmen através da membrana epitelial conhecido como transporte transepitelial (Figura 6). Este se divide no movimento de moléculas através das células denominado transporte transcelular e ainda no movimento entre as células ou paracelular (77). O tamanho e a solubilidade da molécula e sua regulação através das proteínas juncionais são os definidores da rota de permeação da substância. Moléculas maiores, incluindo a lactulose, celobiose, rafinose e Cr51-EDTA, utilizam a via paracelular, enquanto as moléculas menores como o manitol, atravessam o epitélio intestinal pela via transcelular.

Figura 6 - Barreira epitelial intestinal: vias de permeação não-mediadas



Fonte: Modificado de Travis et al. Clinical Science, 1992 (77).

O princípio básico desta técnica baseia-se no conceito de que, quando há uma alteração da barreira mucosa, ocasionando um aumento da permeabilidade, a excreção urinária da substância testada se eleva e sua medida urinária elevada confirma a alteração de permeabilidade intestinal (78). Dentre as substâncias mais utilizadas, destacamos os polietilenoglicóis, contrastes solúveis em água, substâncias radioativas marcadas e açúcares como o manitol, a lactulose, a sucrose, a sucralose, a xilose e a celobiose (77).

Existem resultados conflitantes na literatura em relação ao uso destas substâncias na avaliação da permeabilidade intestinal. *Brignardello et al* analisaram obesos e magros e não encontraram diferenças na excreção destes açúcares entre os grupos testados (75). Em contrapartida, *Teixeira et al* compararam a excreção urinária de lactulose e manitol entre grupos de mulheres obesas e magras e demonstraram que as primeiras excretaram maiores quantidades do que as últimas (79). Apesar disso, esta técnica carece de acurácia e novos trabalhos são necessários neste campo para determinar um método mais eficaz de avaliação da permeabilidade.

A importância de se estabelecer a relação exata entre obesidade e aumento da permeabilidade se deve ao fato de que moléculas nocivas, como o LPS, poderiam estar atravessando a barreira através da rota paracelular. Em ratos obesos, a distribuição anormal de proteínas juncionais, como a zonulina e a ocludina no intestino delgado (46), assim como o alto grau inflamatório influenciado pela microbiota (57), poderiam corroborar com esta hipótese.

Podemos citar outras formas de avaliação indireta da permeabilidade, como, por exemplo, a dosagem da fosforilação da cadeia leve da miosina em amostras de tecido intestinal, assim como a atividade da mieloperoxidase que determina o grau de inflamação e permeação neutrofílica. As citocinas, como o TNF-alfa e o INF-gama (interferon-gama), estão relacionadas ao aumento da expressão da quinase da cadeia leve da miosina, levando à fosforilação da cadeia leve da miosina, e resultante contração do citoesqueleto. Esta contração provoca uma ruptura das *tight junctions* intestinais e, como consequência, aumento da permeabilidade. Todas estas alterações foram encontradas em ratos com propensão à obesidade (80). Em humanos, as análises das proteínas estruturais foram realizadas em peças cirúrgicas ou biópsias intestinais (69), que têm como desvantagem a pouca especificidade, além de serem métodos invasivos. Dentre os métodos não invasivos, destacam-se os biomarcadores de lesão epitelial dosados no sangue, representados pela citrulina, zonulina e claudinas (69, 74).

A questão que relaciona obesidade e possível aumento da permeabilidade intestinal ainda se mantém controversa. O conceito de que a microbiota intestinal de obesos e magros difere entre si tornou o estudo do epitélio intestinal um vasto campo para pesquisas científicas. Porém, ainda faltam dados que possam correlacionar obesidade, microbiota e permeabilidade intestinal, principalmente no entendimento do que seria a causa ou a consequência dessas alterações. Isso se deve, em parte, pelo fato de que a maioria dos estudos no tema são desenhos transversais, ou seja, estão impossibilitados em estabelecer relações

causais e não comprovam a existência de uma sequência temporal. Além disso, a maior parte das pesquisas correlacionando alterações da microbiota intestinal colônica e obesidade analisa tão somente a composição destes microrganismos, ao invés da questão da permeabilidade em si. Somado a isso, menor atenção tem sido dada à microbiota especificamente do intestino delgado, possivelmente pela dificuldade em se obter amostras deste segmento em humanos (65). Entretanto, em estudos experimentais, está demonstrado que as maiores alterações de permeabilidade ocorrem no intestino delgado, enquanto a maior parte dos pesquisadores foca da microbiota do intestino grosso.

Ainda em relação ao epitélio intestinal e suas alterações morfofuncionais, o destaque é em relação à fosfatase alcalina intestinal (FAI). A fosfatase alcalina é uma enzima importante na homeostasia intestinal. Embora o seu mecanismo de ação não seja bem conhecido, sabe-se que ela detoxifica o LPS das bactérias gram-negativas e impede a translocação de microrganismos para a corrente sanguínea (80).

Os primeiros estudos sobre o papel da fosfatase alcalina intestinal (FAI) na inativação do LPS e na prevenção da inflamação intestinal foram realizados em peixes-zebra (81). A FAI está localizada na membrana apical das células intestinais (82), podendo ser clivada e secretada para dentro do lúmen (83-85). As microvilosidades intestinais liberam vesículas altamente enriquecidas com proteínas funcionais, que incluem a FAI (86). Além do papel de desfosforilar moléculas como o LPS, elas impedem a adesão de patógenos e bactérias comensais nas células epiteliais intestinais *in vitro*. Adicionalmente, a própria presença de patógenos estimula a secreção dessas vesículas (87). Posteriormente, foi evidenciado também o suposto papel da FAI na seleção das bactérias que colonizam o cólon, já que camundongos modificados geneticamente para a exclusão desta enzima apresentavam menor quantidade e diversidade bacteriana nas suas fezes, em comparação com os controles (88). Um dos mecanismos propostos na regulação do microbioma intestinal seria a desfosforilação de nucleotídeos no lúmen intestinal, como o ATP (trifosfato de adenosina). A desfosforilação do ATP em ADP (difosfato de adenosina) e AMP (monofosfato de adenosina) pela FAI regula positivamente a microbiota, promovendo maior diversidade bacteriana e aumentando o crescimento de bactérias comensais (89, 90).

Seguindo essa linha de pesquisa, *De La Serre et al* evidenciaram, em seu estudo com ratos obesos e diabéticos, uma diminuição da atividade da fosfatase alcalina intestinal, o que poderia explicar o aumento dos níveis de LPS bacterianos (80). Ratos deficientes em FAI apresentaram, além da elevação dos níveis de LPS, também um aumento da permeabilidade intestinal, em outro estudo. Nesta análise, em um segundo tempo, os autores introduziram

dieta hiperlipídica suplementada com FAI, no grupo controle composto por ratos convencionais. Tal suplementação reverteu as características da síndrome metabólica, demonstrando o importante papel desta enzima (91).

### 3. MICROBIOTA E DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCÓOLICA

A doença hepática gordurosa não-alcóolica (DHGNA) abrange um espectro de anormalidades, que vai desde a esteatose simples, caracterizada pela deposição excessiva de gordura nos hepatócitos sem qualquer inflamação ou necrose, até a esteato-hepatite não-alcóolica ou NASH, caracterizada por esteatose associada à inflamação hepática, e ainda, a fibrose, podendo atingir níveis de cirrose (92).

A determinação definitiva da DHGNA somente pode ser realizada através de biópsia hepática, que segue sendo o padrão-ouro para este diagnóstico. Na prática clínica, tal diagnóstico é estabelecido através de alterações de exames laboratoriais (elevação de transaminases e gama glutamil transferase), associada a exames de imagem (ultrassonografia, ressonância magnética e FibroScan<sup>®</sup>), na ausência de outras causas de fígado gorduroso (álcool, medicamentos, vírus, doenças imunológicas, etc.).

Dentre as causas de DHGNA, podemos citar uma série de fatores. Os fatores primários são associados à síndrome metabólica (obesidade, diabetes mellitus tipo 2 ou resistência à insulina, adiposidade visceral, dislipidemia e hipertensão arterial). Os fatores secundários são associados ao uso de nutrição parenteral total prolongada, desnutrição, perda de peso rápida e acentuada, uso de drogas (como amiodarona, corticóide, tamoxifeno), lipodistrofias, abetalipoproteinemia, doença de Wilson, exposição ocupacional a substâncias voláteis tóxicas, entre outras.

A DHGNA está frequentemente associada à síndrome metabólica ou ainda aos seus componentes individuais (93), sendo a obesidade descrita como fator de risco independente para o seu desenvolvimento (94). Atualmente, a microbiota intestinal tem sido relacionada a alterações no metabolismo do hospedeiro, podendo ter um papel na progressão da DHGNA (95, 96). Essa influência pode estar associada a mecanismos diretos, de forma independente à síndrome metabólica, ou por mecanismos indiretos, via obesidade, resistência à insulina e demais comorbididades deste estado inflamatório.

Alterações na flora intestinal secundárias ao supercrescimento e liberação de endotoxinas bacterianas na circulação (por exemplo, lipopolissacarídeos, peptideoglicanos, lipoproteínas e lipopeptídeos), são também chamados de padrões moleculares associados a patógeno (PAMPs)(97). A endotoxemia parece ser responsável pelo início da lesão hepática, através da interação destes PAMPs com receptores específicos de reconhecimento, os *Toll Like Receptors* (TLRs). Os TLRs, agindo como sensores de patógenos, contribuem para a

resposta imune adaptativa e regulação da inflamação, representando uma ligação entre alterações da flora intestinal, endotoxemia e lesão hepática (98-101).

Dentre as células hepáticas que exibem uma expressão variável de TRLs, são as células de Kupffer que desempenham o papel mais importante e que já tem sua ação bem definida na doença hepática metabólica e alcoólica. Entretanto, sua importância na hepatite viral crônica ainda não está estabelecido. O dado interessante é que existem sugestões de que a microbiota atua através de mecanismos que podem causar injúria hepática sem a ativação de TRLs, entretanto, isso ainda necessita ser confirmado (102, 103).

Os primeiros estudos demonstrando a relação entre endotoxemia e dano hepático foram observados em portadores de hepatites virais. A relação direta entre endotoxemia e necrose intralobular, assim como a regeneração de hepatócitos e diferenciação de células de Ito, foi destaque em pacientes com hepatite viral crônica por vírus B e C (104, 105).

*Caradonna et al* avaliaram os níveis plasmáticos de endotoxina, em portadores de hepatite crônica pelo vírus C, antes e após a terapia com interferon e ribavirina. Em respondedores, o LPS era indetectável, diferente dos não-respondedores, onde o mesmo foi detectável em 42%. Níveis elevados de endotoxinas plasmáticas em pacientes com hepatite C foram associados a uma produção excessiva das citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ . Este excesso de produção pode ter sido causado por uma perda de tolerância dos TLRs, proveniente da combinação de fatores virais e do hospedeiro. Assim, o resultado seria uma hipersensibilidade ao LPS bacteriano, o que poderia estar envolvido na persistência da inflamação em pacientes com hepatite viral crônica (106).

Além destes dados em pacientes com hepatites virais, foram analisados também indivíduos com hepatite alcoólica. Assim como a DHGNA, a doença hepática alcoólica varia desde a simples esteatose até a cirrose. Embora o principal mecanismo de injúria hepática induzida pelo álcool seja dependente do metabolismo direto nos hepatócitos, parece que nesta doença o intestino também participa do início da lesão e sua progressão (107). Bactérias presentes no intestino grosso participam do metabolismo do álcool, resultando na introdução de altas concentrações de acetaldeído no lúmen. O acetaldeído *per se* aumenta a permeabilidade intestinal, indiretamente alterando o equilíbrio da flora e aumentando a quantidade de LPS que chega ao fígado. Através de um mecanismo fisiológico, a flora bacteriana também produz etanol endógeno pela fermentação de carboidratos, entretanto, esta produção é exacerbada quando existe excesso de carboidratos na dieta ou a presença de uma dismotilidade intestinal, como, por exemplo, no diabetes, na obesidade ou no uso crônico de álcool (107).

Investigações iniciais já apontavam para esses resultados. Em 1984, *Bode et al* analisaram a flora intestinal de indivíduos alcóolatrás e demonstraram diferenças qualitativas e quantitativas em relação ao grupo controle (108). Em 1997, *Hauge et al* relataram supercrescimento bacteriano no duodeno de alcóolatrás (109). Em relação a injúria hepática mediada pelo álcool, sabe-se que o óxido nítrico exerce um importante papel patogênico. Para avaliar a sua relação com a barreira epitelial e endotoxinas, *Tang et al* utilizaram ratos alimentados diariamente com etanol e inibidores da óxido nítrico sintetase. Com isso, foi possível demonstrar uma atenuação da cascata de lesões álcool-induzidas, bem como da alteração da permeabilidade intestinal, endotoxemia e, em última análise, a melhora histológica na lesão hepática (110).

Esses trabalhos apontaram para o papel da microbiota e sua possível relação com a permeabilidade intestinal e também com a injúria hepática. Posteriormente, com a descoberta de que a flora de obesos diferia daqueles magros, novos horizontes de pesquisa foram criados. A presença de lesão hepática nestes indivíduos, o que é muito prevalente, poderia ser explicada em parte pelo efeito da endotoxemia, e não somente pelo acúmulo ectópico de gordura proveniente da dieta.

### **3.1 Microbiota e resistência à insulina, causando danos hepáticos**

A resistência à insulina desempenha um papel central no desenvolvimento da esteatose e inflamação hepáticas. Recentemente foi sugerido o papel da microflora intestinal na indução da resistência insulínica (101).

Estudos demonstram que indivíduos com DHGNA têm um aumento da permeabilidade intestinal (93, 111). Níveis de endotoxina no soro são maiores em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2, um estado clássico de resistência à insulina (47). A modificação da microbiota intestinal de ratos com probióticos ou antibióticos foi capaz de reduzir os níveis de citocinas inflamatórias séricas, melhorando a resistência à insulina e reduzindo a esteatose hepática observada na histologia (112). No entanto, a extrapolação destes dados para os seres humanos pode ser difícil devido às diferenças na dieta, genética, metabolismo, fatores ambientais e a presença de condições de doença associadas (113).

A hipótese de “dois hits” considera a esteatose hepática como o primeiro “hit” que sensibiliza hepatócitos para uma variedade de outros insultos; um desses insultos (o segundo

“hit”) induz a progressão, em alguns casos, de DHGNA para NASH(114). O segundo “hit” inclui fatores genéticos, estresse oxidativo, a sinalização mediada pelos TLR em células de Kupffer e citocinas inflamatórias derivadas do tecido adiposo. A microbiota intestinal pode ser mais um fator para um segundo “hit”, quer através de mecanismos imunes inatos ou através da produção endógena excessiva de álcool.

O fígado é rico em células do sistema imune inato (115). Estas células podem reconhecer moléculas e substâncias exógenas que carregam padrões específicos, através de receptores, incluindo os TLRs. A interação destes receptores com produtos bacterianos conduz a ativação de diversas vias inflamatórias, incluindo os inflamassomas.

O inflamassoma é um complexo multiproteico intracelular que atua na ativação de enzimas da família cisteína-aspartato proteases (CASPASES) e que funcionam como uma estrutura essencial para a regulação da imunidade em condições fisiológicas e, ainda, no reconhecimento de sinais de perigo a diferentes componentes. Estes sinais podem ser produtos microbianos, adjuvantes ou alterações no ambiente iônico intra e extracelular (116). O inflamassoma age ativando a caspase-1, que cliva pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18 em citocinas pró-inflamatórias (113).

A função dos inflamassomas, porém, permanece complexa. Sua deficiência em colonócitos de ratos está associada a um padrão patogênico do cólon, com aumento do filo *Bacteroidetes* e redução de *Firmicutes*(117). Ratos geneticamente modificados, com ausência de inflamassomas, demonstram alterações na flora intestinal, bem como o aumento dos níveis de LPS e DNA bacteriano capazes de, respectivamente, se ligar a TLR9 e TLR4 no fluxo portal, aumentando a expressão hepática do TNF- $\alpha$  e, conseqüentemente, o grau de esteatose hepática e esteatohepatite (118).

Foi observado, em ratos, que o TLR4 localizado nas células de Kupffer desempenhou um papel-chave na mediação da progressão da esteatose hepática para NASH (119); em contraste, a deficiência de TLR4 foi capaz de atenuar o NASH (120). O excesso de citocinas pró-inflamatórias, especialmente o TNF- $\alpha$ , também parece contribuir para a progressão da doença NASH em humanos (121). Analogamente, tais descobertas sugerem que uma deficiência genética da função dos inflamassomas em alguns indivíduos pode levar à alterações na microbiota intestinal, que, por sua vez, ao aumentar o nível hepático de citocinas pró-inflamatórias, pode promover a progressão da esteatose para NASH (113).

Além das hipóteses discutidas acima, outro mecanismo que pode estar envolvido na progressão da lesão hepática é a produção endógena de álcool (etanol). Sob condições fisiológicas, o corpo humano produz uma pequena quantidade de álcool. A flora intestinal é a

principal fonte deste álcool endógeno (122) e testes em pacientes após o tratamento com neomicina demonstram uma redução da concentração de etanol expirado. Esse álcool endógeno é eficientemente oxidado no fígado pela enzima álcool desidrogenase (123). Há dados na literatura que corroboram com essa hipótese. Recentemente, foi demonstrado que os pacientes com NASH têm excesso de *Escherichia coli* produtoras de álcool e elevados níveis de etanol séricos (124). Já em outro estudo, indivíduos com NASH tiveram uma expressão aumentada de enzimas metabolizadoras de etanol (125).

Um dado interessante é que o etanol é conhecido por aumentar a permeabilidade da mucosa intestinal e os níveis séricos de endotoxina, particularmente em pacientes com doença hepática alcóolica (126). A extrapolação dessas evidências para os pacientes portadores de DHGNA ainda necessita ser esclarecida e algumas questões ainda carecem de respostas, como, por exemplo: qual seria precisamente o papel da composição da microbiota em pacientes com DHGNA? A inflamação da mucosa microbiota-mediada tem impacto no status da DHGNA? A disbiose intestinal prejudica a barreira mucosa intestinal em pacientes nesta condição?

O estudo mais recente tentando relacionar permeabilidade da mucosa intestinal, DHGNA e aumento de bactérias produtoras de álcool foi realizado por *Weiwei et al.* Neste, foram selecionados 85 participantes e foi observado um aumento de *Escherichia* produtoras de álcool, dentro do filo *Proteobacteria*, na microbiota do grupo esteatose hepática, em comparação com a do grupo controle. Além disso, nesta pesquisa foi observado que o grupo controle permanecia com as *tight junctions* duodenais mais preservadas, assim como os microvilos mais alinhados e extensos. Os níveis de ocludina também foram maiores nos indivíduos saudáveis. Já os níveis de linfócitos CD4 e CD8 intraepiteliais foram menores nos indivíduos com DHGNA (93).

Salvo os mecanismos descritos acima, envolvendo a produção de etanol pela microbiota intestinal e a liberação de LPS ativando os TLRs, a disbiose parece influenciar também o parênquima hepático através do aumento de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), da supressão de FIAF e do metabolismo da fosfatidilcolina (127).

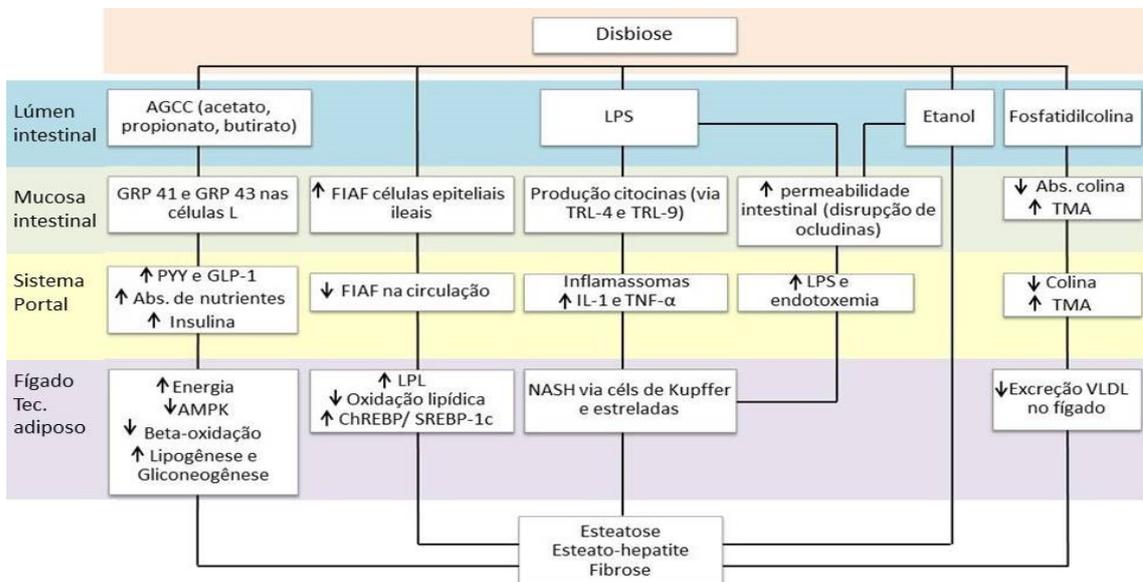
Os AGCC têm efeitos sobre receptores acoplados à proteína G, tanto o GPR41 quanto o GPR43, causando a liberação do peptídeo YY (PYY) e peptídeo símile de glucagon-1 (GLP-1), respectivamente, pelas células L neuroendócrinas. O aumento da liberação de energia na forma de AGCCs também inibe a proteína quinase ativada com adenosina monofosfato (AMPK) no fígado, o que aumenta o acúmulo de ácidos graxos livres hepáticos

(AGL) via diminuição da  $\beta$ -oxidação. Isso acaba por favorecer a lipogênese e a gliconeogênese (127).

A disbiose inibe o FIAF, que por sua vez, inibe o LPL (lipoproteína lipase endotelial). O LPL é responsável pela liberação dos triglicerídeos derivados de quilomícrons circulantes e VLDL. A diminuição dos níveis circulantes de FIAF resultam na transativação de enzimas lipogênicas hepáticas pelo ChREBP (proteína de ligação a elemento responsiva a carboidratos) e SREBP-1c (proteína reguladora de elemento 1c esterol). O efeito final é o acúmulo de triglicerídeos nos adipócitos e fígado (127).

Por fim, a microbiota intestinal converte a fosfatidilcolina dietética (PDC) em colina e trimetilamina (TMA), que é hepatotóxica. A redução da disponibilidade da colina dietética inibe a excreção de VLDL pelo fígado, induzindo à esteatose. A figura 7 resume os possíveis mecanismos ligando disbiose e DHGNA (127).

Figura 7 – Eixo intestino-fígado na progressão da DHGNA



Fonte: Modificado de Leung et al. Nature Reviews, 2016 (127).

### 3.2 Microbiota e fibrogênese hepática

A fibrose consiste na deposição de colágeno e outras proteínas da matriz extracelular em espaços intercelulares, sendo uma resposta às várias formas de lesão hepática, independentemente da causa, incluindo infecções virais, doenças metabólicas, exposição a toxinas, entre outras.

A fibrose hepática é mediada principalmente pela ativação das células estreladas hepáticas, juntamente com fibroblastos e miofibroblastos portais. Várias citocinas, quimiocinas, fatores do sistema imunológico e LPS são sabidamente capazes de ativar as células estreladas e, portanto, aumentar a fibrose hepática (113). Pacientes com fibrose e cirrose têm alterações na microbiota intestinal, sendo estas mais marcantes em doenças avançadas (128, 129).

A maioria dos dados relacionando microbiota intestinal com fibrose baseia-se em estudos animais e sugerem um possível papel da microbiota intestinal na fibrogênese hepática. Dados humanos sobre essa associação se limitam a estudos observacionais, demonstrando alterações qualitativas e quantitativas na microbiota intestinal na cirrose e são atualmente insuficientes para provar uma relação de causa-efeito (113).

Uma revisão sistemática recente reuniu os estudos existentes correlacionando disbiose intestinal e DHGNA, com ênfase nas características da microbiota. Foram selecionados nove estudos, sendo quatro em modelos animais e cinco em humanos (Tabela 5) (130).

Tabela 5 - Resumo dos principais estudos sobre disbiose intestinal e DHGNA

AUTOR	TÍTULO	REVISTA/ANO
<b>MODELOS ANIMAIS</b>		
Cano et al	Bifidobacterium CECT 7765 melhora as alterações metabólicas e imunológicas associadas à obesidade em camundongos alimentados com dieta rica em gordura.	Obesity/2013
Zeng et al	Fígado gorduroso acompanha o aumento de espécies de lactobacilos no intestino de camundongos C57BL / 6 alimentados com dieta rica em gordura.	J Nutr/2013
Le Roy et al	Microbiota intestinal no desenvolvimento de doença hepática gordurosa não alcoólica em camundongos.	Gut/2013
Henao et al	A disbiose mediada pelo inflamassomo regula a progressão da DHGNA e da obesidade.	Nature/2012
Elinav et al	O NLRP6 inflamassoma regula a ecologia microbiana colônica e o risco de colite.	Cell/2011
<b>MODELOS HUMANOS</b>		
Spencer et al	Associação entre a composição do microbioma gastrointestinal humano e o desenvolvimento de fígado gorduroso com deficiência de colina.	Gastroenterology/2011
Zhu et al	Caracterização de microbiomas intestinais em pacientes com esteato-hepatite não alcoólica (EHNA): uma conexão entre o álcool endógeno e a EHNA.	Hepatology/2013
Mouzaki et al	Microbiota intestinal em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica.	Hepatology/2013
Raman et al	Microbiome fecal e composto orgânico volátil no fígado gorduroso não-alcoólico.	Clin Gas Hepatol/2013
Wong et al	Caracterização molecular da microbiota fecal em pacientes com esteato-hepatite não-alcoólica - um estudo longitudinal.	PLoS ONE/2013

Fonte: Modificado de Wieland et al. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 2015 (130).

### 3.3 Microbiota e ação independente à síndrome metabólica

Le Roy *et al* demonstraram o papel da microbiota intestinal no desenvolvimento DHGNA, independente da obesidade, utilizando experimentos de transplante em camundongos. Neste experimento, camundongos C57BL / 6J doadores foram selecionados, com base nas suas respostas, a uma dieta rica em gordura. Estes animais, apesar do ganho ponderal semelhante, foram divididos em dois grupos: respondedores, isto é, aqueles que desenvolveram hiperglicemia e concentrações plasmáticas elevadas de citocinas pró-inflamatórias e os não respondedores, ou seja, aqueles que se mantiveram normoglicêmicos e com níveis inferiores de inflamação sistêmica. Camundongos *germ-free* foram então

colonizados com a microbiota intestinal destes doadores e alimentados com a mesma dieta rica em gordura. Com isso, foi possível observar que os camundongos que receberam microbiota destes diferentes doadores desenvolveram obesidade de forma significativa em comparação aos controles. O grupo respondedor-receptor (RR), desenvolveu hiperglicemia e insulinemia, ao passo que o grupo não respondedor-receptor (NRR) manteve-se normoglicêmico. Além disso, o grupo RR teve maior incidência de esteatose hepática macrovesicular, confirmada por uma maior concentração de triglicerídeos hepáticos e aumento da expressão de genes envolvidos na lipogênese. Camundongos RR e NRR diferiam também na microbiota em relação ao filo, gênero e níveis de espécies (131).

A microbiota intestinal tem uma relação estreita com o sistema imunológico. A disfunção do sistema imune é observada durante a progressão da DHGNA (132, 133). Além disso, as bactérias colônicas produzem muitos produtos metabólicos, incluindo etanol endógeno e outras endotoxinas, que exercem efeitos tóxicos sobre o hospedeiro humano após a absorção e re-circulação destas toxinas pela circulação enterohepática, induzindo a esteatose hepática e esteatohepatite (134).

### 3.4 Estudos conflitantes

Apesar dos possíveis mecanismos descritos acima sobre o envolvimento da microbiota na indução/progressão da doença hepática, encontramos resultados conflitantes na literatura. Alguns estudos falharam em observar o aumento do LPS em pacientes com NASH (135, 136), sugerindo que mecanismos alternativos podem estar envolvidos. No entanto, é importante salientar que a medição e interpretação da endotoxemia periférica em seres humanos é complexa. Como descrito anteriormente, os níveis de LPS e LBP séricos têm amplos intervalos que se sobrepõem às variações fisiológicas normais (76, 137). Além disso, tais estudos são limitados, pois o nível do LPS periférico pode não refletir o nível do LPS portal, variando ao longo do tempo (135). Em outras palavras, o aumento da permeabilidade intestinal pode expor o fígado a níveis deletérios de LPS, tendo pouca correlação com seus níveis séricos periféricos, já que grande parte do mesmo é depurado pelo sistema porta (127).

Além do LPS, o filo bacteriano supostamente prevalente em obesos (*Firmicutes*) também é alvo de críticas. *Zhu et al* estudou a microbiota intestinal de crianças obesas (com ou sem NASH) e controles, tendo observado um aumento da relação *Bacteroidetes* /

*Firmicutes* nos primeiros (124). Tais dados foram confirmados também em adultos (138). Outros autores, por sua vez, não encontraram diferenças estatísticas no microbioma de obesos e controles (134, 139, 140).

Com base no exposto, podemos inferir que os micróbios intestinais parecem desempenhar um papel patogênico nas várias formas de doença hepática e suas complicações, porém os mecanismos pelos quais isso ocorre ainda são desconhecidos. Uma melhor compreensão das perturbações na flora intestinal deverá nos permitir aperfeiçoar determinados tratamentos e melhorar a sua eficácia nos próximos anos. Novos estudos merecem ser iniciados nesse campo.

#### 4. JUSTIFICATIVA

Ainda é pouco conhecido o papel da MI e sua relação com determinadas comorbidades em estudos clínicos. No entanto, parece-nos bastante promissor supor que a disregulação da MI, através da maior permeabilidade da mucosa intestinal ao LPS, da maior absorção de nutrientes da dieta ou ainda pela modulação do genoma do hospedeiro, deflagraria o gatilho necessário ao estabelecimento da inflamação sistêmica de baixo grau intimamente associado ao fenótipo inflamatório do obeso. A confirmação desta hipótese pode indicar a necessidade de novas pesquisas, com o intuito de propor meios para “neutralizar/atenuar” os efeitos deletérios das mudanças na composição da MI.

Diante de todo o conhecimento exposto, a nossa hipótese é que indivíduos obesos e/ou disglucêmicos diferem daqueles magros em relação à microbiota intestinal e aos níveis de LPS e, principalmente, acreditamos que tanto a microbiota intestinal quanto os níveis de LPS estariam associados a alterações morfofuncionais do epitélio intestinal e do tecido hepático.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Primário**

Estudar a correlação entre os marcadores séricos inflamatórios, a morfologia e microbiota intestinais e o grau de esteatose/fibrose hepáticas em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose e de adiposidade corporal.

### **5.2 Secundário**

Comparar os marcadores séricos inflamatórios, o grau de esteatose/fibrose hepáticas e a morfologia e microbiota intestinais entre os grupos de indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose e adiposidade corporal.

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado na Universidade do Estado do Rio de Janeiro. As unidades envolvidas foram: as Disciplinas de Endocrinologia, de Gastroenterologia e de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM); o Laboratório de Lípidos (LabLip) da Policlínica Piquet Carneiro; o Laboratório de Pesquisas Clínicas e Experimentais em Biologia Vascular (BioVasc); o Laboratório de Genoma do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG); o Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG). Além disso, tivemos o apoio da Divisão de Patologia do Instituto Nacional de Câncer (INCA - DIPAT).

### 6.1 Participantes

Convidamos a participar pacientes obesos (com disglícemia ou tolerância normal à glicose) e indivíduos com peso normal ou sobrepeso (com tolerância normal à glicose). A disglícemia foi definida pelos critérios da Sociedade Brasileira de Diabetes (141) (Tabela 5). Foram recrutados 46 indivíduos, sendo os mesmos distribuídos em três grupos: obesos com disglícemia (**grupo OBD**), obesos com normoglicemia (**grupo OB**) e magros/sobrepeso com normoglicemia (**grupo controle - C**).

Tabela 6 – Critérios Diagnósticos para Diabetes Mellitus

<b>Glicemia de Jejum</b>	<b>Classificação</b>
70 – 99 mg/dL	Normal
100 – 125 mg/dL	Alteração da glicemia de jejum
> 126 mg/dL	Diabetes Mellitus
Teste oral de tolerância à glicose (75g) > 200 mg/dL em 120'	Diabetes Mellitus

Fonte: Sociedade Brasileira de Diabetes, 2013-2014 (141).

Os parâmetros clínicos iniciais abordados no estudo foram: idade, sexo, índice de massa corporal (IMC), presença de comorbidades, uso de medicações, queixas gastrointestinais, cirurgias prévias, etilismo (ausente, presente, prévio) e tabagismo (ausente, presente, prévio). Este estudo foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Pedro Ernesto (Parecer CEP nº 419.676 de 09/10/2013).

## **6.2 Critérios de inclusão**

Foram selecionados homens e mulheres com:

1. Idade entre 18 e 50 anos;
2. Indivíduos com IMC entre 30-40 kg/m<sup>2</sup> com e sem disglícemia e
3. Indivíduos com IMC entre 20-27,5 kg/m<sup>2</sup> com normoglicemia.

## **6.3 Critérios de exclusão**

Excluimos os indivíduos com pelos menos um dos seguintes critérios:

1. doença aguda, no momento da coleta das amostras, definida pela presença de doença moderada ou grave, com ou sem febre;
2. doenças crônicas pulmonares, cardiovasculares, hematológicas, gastrointestinais, hepáticas ou renais;
3. história dietética instável, definida como grandes mudanças na dieta durante o mês anterior, diagnosticada por nutricionista especializada;
4. história de distúrbios gastrointestinais em atividade ou doenças crônicas, incluindo - doenças inflamatórias intestinais (DII), diarreias crônicas de etiologia não definidas, constipação crônica, síndromes disabsortivas, histórico de grande cirurgia do trato gastrointestinal, exceto colecistectomia e apendicectomia;

5. uso de seguintes medicamentos/probióticos nos últimos 06 meses - antibióticos sistêmicos, corticosteroides orais, citocinas, metotrexato ou agentes imunossuppressores citotóxicos, consumo de grandes doses de probióticos comerciais (superior ou igual a  $10^8$  UFC ou organismos por dia, através das diversas formas de apresentação);
6. testes positivos para infecção por HIV e por hepatites B e C;
7. gestantes e lactantes;
8. fumantes e
9. etilismo.

#### **6.4 Desenho do estudo**

Este é um estudo transversal, onde previu-se a alocação de 46 participantes nos três grupos citados acima: OBD, OB e C.

#### **6.5 Etapas do estudo**

Os pacientes seguiram as etapas conforme a tabela 7.

Tabela 7 - Etapas do Estudo

1°	2°	3°
.Seleção do paciente, exame clínico e laboratorial.	.Entrega da amostra de fezes para microbiota.	.Estudo do grau de esteatose/fibrose hepáticas.
.Inclusão do paciente no estudo e assinatura do TCLE.	.Avaliação antropométrica e alimentar.	.Endoscopia digestiva alta com biópsia duodenal.
	.Coletas de amostras sanguíneas em jejum e após refeição padrão (marcadores inflamatórios, LPS e peptídeos intestinais).	

Fonte: O Autor, 2018

### 6.5.1 Primeira etapa

Na entrevista inicial, pesquisamos os hábitos de vida dos pacientes, como tabagismo e etilismo, presença de comorbidades como hipertensão arterial e diabetes, assim como medicações em uso. Avaliamos ainda o hábito intestinal, uso de probióticos (em especial o seu uso na forma de iogurtes), medicamentos que possam potencialmente interferir com a microbiota intestinal, como antibióticos e imunossupressores, além da condição socioeconômica. Nesta consulta, aferimos a estatura e peso, para o cálculo do IMC, e ainda medimos as circunferências da cintura e quadril dos pacientes. A massa corporal (kg) foi mensurada em balança plataforma da marca Filizola® com precisão de 100 g. A estatura foi aferida com estadiômetro, com precisão de 0,1cm. O IMC foi obtido pela divisão do peso (kg) pela altura<sup>2</sup> (m). A cintura foi medida em duplicata com fita flexível com precisão de 0,1 cm no ponto médio entre o último arco costal e a crista ilíaca, durante a expiração. A circunferência do quadril foi medida em duplicata no ponto de maior circunferência da região glútea. A RCQ foi obtida pela divisão da cintura pelo quadril. As médias das medidas em duplicata da cintura e do quadril foram utilizadas nas análises. Nesta etapa foi ainda solicitada a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

Os exames laboratoriais iniciais foram: hemograma completo, ureia, creatinina, perfil lipídico, glicose de jejum, hemoglobina glicada, insulina, hepatograma completo, amilase,

lipase, coagulograma, sorologias para hepatites B, C e HIV, cinética do ferro, fator antinuclear, anticorpo anti-músculo liso, eletroforese de proteínas, anticorpo anti-mitocôndria, ceruloplasmina e  $\alpha 1$  anti-tripsina.

### 6.5.2 Segunda etapa

Após a seleção, o voluntário foi encaminhado para a avaliação da gordura corporal. A avaliação da bioimpedância (Byo dynamics 450 Body Composition Analyzer<sup>TM</sup>, Bio Dynamic Corporation®, SE, EUA) foi feita com os pacientes em jejum de 8 horas e sem ingestão de bebida alcoólica ou prática de atividade física nas 24 horas que precederam o exame. A porcentagem de massa magra e gorda de cada indivíduo foi aferida. Posteriormente, aplicamos o questionário de frequência alimentar e, em seguida, realizamos as dosagens de marcadores bioquímicos e inflamatórios: glicose, insulina, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), proteína de ligação ao LPS (LBP), insulina, interleucina-6 (IL-6), adiponectina, leptina, peptídeo glucagon-símile-1 (GLP-1), RBP-4 (proteína ligante do retinol 4), perfil lipídico e grelina.

Nesta etapa, os pacientes foram instruídos em relação à coleta da microbiota fecal, sendo fornecido aos mesmos recipientes específicos e folheto explicativo (Anexo A). Neste momento, foi agendado o retorno para a entrega da amostra de fezes e realização da última etapa do estudo.

### 6.5.3 Terceira etapa

Nesta etapa, os pacientes realizaram a endoscopia digestiva alta com biópsia duodenal e elastografia hepática transitória, preferencialmente no mesmo dia, após jejum de 12 horas.

## 6.6 Métodos laboratoriais

Parte das amostras coletadas foi imediatamente centrifugada e encaminhada para análise no Laboratório de Lípides (LabLip) da Policlínica Piquet Carneiro – UERJ, que realizou a dosagem de glicose. Outra parte destas amostras foi processada com inibidores específicos, separada em centrífuga refrigerada e congelada a  $-80^{\circ}$  C. Os biomarcadores de inflamação e os peptídeos intestinais foram analisados no aparelho Milliplex<sup>®</sup>MAP Human Metabolic Hormone Magnetic Bead Panel (EMD Millipore, Billerica, MA, EUA) no BioVasc. A coleta foi feita após jejum de 8 horas, em todos os grupos, nos tempos basal, 30 e 60 minutos, após ingestão de refeição padrão Nutridrink<sup>®</sup> (Danone<sup>®</sup>, Paris, França). A coleta de sangue foi realizada no Biovasc através da inserção de um cateter venoso no membro superior esquerdo. A refeição padrão (Nutridrink<sup>®</sup>; sabores baunilha ou chocolate) tinha um volume de 200ml de solução (frasco inteiro) e era composta por: valor calórico – 300 kcal, proteínas – 20g, carboidratos – 32g, gorduras totais – 10,6g, gorduras saturadas – 1,2g, gorduras monoinsaturadas – 6,4g, gorduras polinsaturadas – 3g, cálcio – 560mg, ferro – 4,2mg, sódio – 100mg, potássio – 400mg, cloro – 166mg, fósforo – 390mg, magnésio – 80mg, zinco – 3,2mg, cobre – 676mg, manganês – 1,2mg, flúor – 0,4mg, molibdênio – 39mcg, selênio – 22mcg, cromo – 26mcg, iodo – 50mcg, vitamina A 376mcg, vitamina D – 2,6mcg, vitamina E – 4,6mcg, vitamina K – 20mcg, vitamina B1 – 0,56mg, vitamina B2 – 0,62mg, niacina – 6,8mg, ácido pantotênico – 2mg, vitamina B6 – 0,66mg, ácido fólico – 100mg, vitamina B12 – 1,4mcg, biotina – 15mcg, vitamina C – 38mg, colina – 138mg.

Realizamos as medidas de glicose, insulina e marcadores inflamatórios nos três tempos, conforme descrito anteriormente (basal, 30 e 60 minutos). A bioquímica foi realizada com analisador automático *A25 BioSystems* (*Biosystems S.A*, Barcelona, ESP). Glicose, colesterol total, HDL e TG foram quantificados por espectrofotometria pelos seguintes métodos, respectivamente: glicose oxidase/peroxidase [Coeficiente de variação (CV) intraensaio: 1,2% e interensaio: 2,7%], colesterol total (colesterol oxidase peroxidase), HDL colesterol e triglicerídeos (colorimétrico enzimático). O LDL foi calculado pela equação de Friedewald (142).

O índice de resistência insulínica utilizado, baseado na glicemia e insulinemia de jejum, foi o HOMA-IR (143).

$$\checkmark \text{ HOMA-IR: (Glicemia de jejum mmol/L x insulinemia de jejum } \mu\text{UI/mL})/22,5$$

### 6.6.1 Metodologia para Análise de Biomarcadores por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

As avaliações dos níveis sanguíneos de IL-6, TNF- $\alpha$ , adiponectina e RBP-4 foram realizadas, respectivamente, pelos seguintes kits de ELISA comercialmente disponíveis: Human IL-6 HS Quantikine® *ELISA kit*, sensibilidade: 0,039 pg/ml, CV% intraensaio < 10,51%, CV% inter-ensaio 1,68%; Human TNF- $\alpha$  HS Quantikine® *ELISA kit*, sensibilidade: 0,106 pg/ml, CV% intraensaio < 6,8%, CV% inter-ensaio < 3,53%; Human Total Adiponectin/Acrp30 Quantikine® *ELISA Kit*, sensibilidade 0,246 ng/ml, CV% intraensaio < 5,14%, CV% inter-ensaio 1,50%; e Human RBP-4 Quantikine® *ELISA kit* (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA), sensibilidade 0,224 ng/ml; CV% intraensaio < 3,56%, CV% inter-ensaio 3.25%. Para dosagem de LBP foi utilizado o kit LBP Human ELISA kit (Hycult Biotech, Uden, Holanda) que apresenta sensibilidade, CV% intraensaio e CV% inter-ensaio, respectivamente: <4,4 ng/ml, < 3,5% e 0,13%. Todos os kits utilizados foram do formato sanduíche. Nesse formato, os padrões de concentração e das amostras (diluídas conforme recomendação do protocolo do kit) foram adicionados à placa do ensaio e durante o período de incubação as moléculas do biomarcador de interesse se ligam a anticorpos monoclonais específicos presentes no fundo das cavidades da microplaca. Em seguida, foi realizado um ciclo de lavagem para remoção de ligações inespecíficas e, ao final dessa etapa, anticorpos policlonais conjugados às enzimas peroxidase ou fosfatase alcalina foram adicionados à placa, ligando-se às moléculas do biomarcador de interesse aprisionadas no fundo da placa. Posteriormente, foi realizado um novo ciclo de lavagem para remover ligações inespecíficas e, em seguida, os substratos das enzimas e seus respectivos cromógenos foram adicionados à placa. Nessa etapa, as enzimas conjugadas presentes nas amostras ou nos padrões de concentração reagiram com seus substratos e, o produto da reação, por sua vez, combina-se com cromógeno promovendo o aparecimento de uma coloração cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração da enzima conjugada e conseqüentemente do biomarcador de interesse. Ao final do ensaio, a reação enzimática foi inibida com a adição de uma solução ácida e, foi então realizada a mensuração da densidade óptica de cada uma das 96 cavidades da microplaca através de um Leitor Universal de Microplacas (Bio Tek, modelo ELX 800, Winooski, VT, EUA).

A concentração do biomarcador de interesse foi determinada fazendo a correlação do valor de densidade óptica das amostras com os valores de densidade óptica da curva-padrão

gerada, através do ajuste logístico de quatro parâmetros com auxílio de um programa de análise de dados adequado (KC Junior, Bio Tek, Winooski, VT, EUA).

#### 6.6.2 Metodologia para análise simultânea de múltiplos analitos (formato magnético)

A metodologia para análise simultânea de múltiplos analitos (multiplexing) foi utilizada para avaliação da concentração plasmática de insulina (sensibilidade: 87 pg/ml; CV% intraensaio: <10%; CV% inter-ensaio: <20%); leptina (sensibilidade: 7,8pg/ml; CV% intraensaio: <1,25%; CV% inter-ensaio: 5,07%) e grelina (sensibilidade: 13 pg/ml; CV% intraensaio: <10%; CV% inter-ensaio: <20%) por meio do painel metabólico Milliplex<sup>®</sup>MAP Human Metabolic Hormone Magnetic Bead Panel (EMD Millipore, Billerica, MA, EUA). Nesse método, as *beads* ou microesferas magnéticas revestidas por anticorpos contra os analitos supracitados foram transferidas para o *mixing bottle* onde são diluídas no reagente apropriado para posterior aplicação no ensaio. Em seguida o padrão de calibração do ensaio foi reconstituído apropriadamente. Após a total dissolução do padrão de calibração, foi realizada uma diluição em série para a construção da curva-padrão.

Após o preparo, os padrões de calibração, as amostras de plasma (diluídas conforme instrução do fabricante) e as microesferas foram aplicados na placa de 96 cavidades. Ao fim dessa etapa, a placa foi incubada à 4°C sob agitação (500 rpm), no agitador orbital de microplacas (Orbit P4, Labnet International, Inc., Woodbridge, NJ, EUA) *overnight* por 16-18 horas. Ao término dessa etapa realizou-se um ciclo de lavagem para remoção das ligações inespecíficas. Em seguida, foi adicionado o anticorpo de detecção e foi realizado uma nova incubação por uma hora à temperatura ambiente sob agitação (500 rpm). Ao término dessa incubação, aplicou-se a estreptavidina-ficoeritrina e a placa foi incubada por mais 30 minutos sob agitação (500 rpm), com posterior novo ciclo de lavagem. Finalmente foi adicionado o fluido isotônico em todos os poços para leitura no equipamento Luminex 200 (Luminex Corporation, Austin, TX, EUA).

A concentração de todos o analitos supracitados foi determinada fazendo a correlação do valor de fluorescência das amostras com os valores de fluorescência da curva-padrão gerada através do ajuste logístico de cinco parâmetros com auxílio de um programa de análise

de dados adequado (Milliplex Analyst Software, Vigene Tech, EMD Millipore, Billerica, MA, EUA).

### 6.6.3 Metodologia para Análise de GLP-1 por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) Quimioluminescente

A mensuração dos níveis plasmáticos de GLP-1 foi avaliada por quimioluminescência, através do kit *High sensitivity GLP-1 active chemiluminescent kit* (Merck-Millipore, Billerica, MA, EUA), com sensibilidade 0,14 pM, CV% intraensaio < 10% e CV% inter-ensaio <15%; no formato sanduíche.

Nesse formato, os padrões de concentração, as amostras de plasma sem diluição e o anticorpo de captura anti-GLP-1 foram adicionados à placa do ensaio e durante as duas horas de incubação, sob agitação à temperatura ambiente, as moléculas GLP-1 formaram um complexo antígeno-anticorpo com os anticorpos presentes no fundo da microplaca e com os anticorpos de captura. Em seguida, realizamos um ciclo de lavagem para remoção de ligações inespecíficas e, ao final dessa etapa, os anticorpos de detecção biotinilados foram adicionados à placa e mais uma incubação foi realizada. Durante essa incubação (1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação), o anticorpo de detecção se ligou ao anticorpo de captura e, por conseguinte, ao complexo formado entre os anticorpos aprisionados no fundo da placa e moléculas do GLP-1. Posteriormente, realizamos um novo ciclo de lavagem para remover ligações inespecíficas e, em seguida, foi realizada uma nova incubação de 30 minutos, à temperatura ambiente e sob agitação, com uma solução enzimática contendo a estreptavidina-peroxidase. Ao fim dessa etapa, outro ciclo de lavagem foi realizado e a solução do substrato contendo peróxido de hidrogênio (substrato da peroxidase) e luminol foi aplicada à placa e incubada por um minuto, à temperatura ambiente, sob agitação. Nessa etapa, a peroxidase presente nas amostras ou nos padrões de concentração, reagiu com o peróxido de hidrogênio e produto da reação, que é o oxigênio, oxidou o luminol, formando a substância 3-aminofalato, que emite quimioluminescência cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração do GLP-1. Ao final do ensaio, foi então realizada a mensuração da quimioluminescência de cada uma das 96 cavidades da microplaca através de um Luminômetro Sinergy 2 (Bio Tek modelo ELX 800, Winooski, VT, EUA).

A concentração do GLP-1 foi determinada fazendo a correlação do valor de densidade óptica das amostras com os valores de quimioluminescência da curva-padrão gerada através do ajuste logístico de cinco parâmetros com auxílio de um programa de análise Gen 5 (Bio Tek, Winooski, VT, EUA).

#### 6.6.4 Metodologia para determinação da concentração sérica de LPS

Utilizamos o Kit Limulus Amebocyte Lysate (LAL), referência QCL1000 (Lonza, Walkersville, MD, EUA). Esse método de quantificação se baseia na conversão de uma proenzima presente no *kit* em enzima ativa pelo LPS, o qual pode ser encontrado no soro. A enzima ativa converteu o substrato incolor Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNitroalínina (pNA) em pNA e água, o que confere uma coloração amarela à solução. A intensidade da coloração amarela foi medida por espectrofotometria à 405-410 nm, cujo resultado é diretamente proporcional a concentração de LPS (endotoxina) presente na amostra.

Resumidamente, 50 µL de padrões de concentração e amostras (diluídas 1:2 em água reagente para LAL) foram adicionados à placa do ensaio pré-aquecida à 37°C em banho-seco (Uniscience, São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, foram adicionados 50 µL em todos os poços e a placa colocada no banho-seco para incubação à 37°C por 10 minutos. Ao término dessa incubação, foram adicionados 100 µL do substrato cromogênico em todos os poços e incubase novamente à 37°C durante seis minutos. Ao final dessa incubação, foram adicionados 10 µL da solução de parada (ácido acético 25%) em todos os poços. Em seguida, foi realizada a mensuração da densidade óptica de cada uma das 96 cavidades da microplaca através de um Leitor Universal de Microplacas (Bio Tek modelo ELX 800, Winooski, VT, EUA).

Determinamos a concentração do LPS fazendo a correlação do valor de densidade óptica das amostras com os valores de densidade óptica da curva-padrão, gerada através do ajuste linear, com auxílio de um programa de análise de dados adequado (KC Junior, Bio Tek, Winooski, VT, EUA).

#### 6.6.5 Categorização da glicemia de jejum alterada

O diagnóstico de glicemia de jejum alterada foi realizado conforme os critérios da *American Diabetes Association* (144). Dessa forma, caracterizou-se como euglicêmico/normotolerante o indivíduo com glicemia de jejum (GJ)  $<100$  mg/dL e/ou glicemia de 2 horas durante o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) 75 g  $<140$  mg/dL. A presença de pré-diabetes foi caracterizada por GJ variando de 100-125 mg/dL e/ou glicemia de 2 horas no TTGO 75 g de 140-199 mg/dL. A hemoglobina glicada (HbA1c)  $\geq 5,7\%$  também foi utilizada como critério para diferenciação entre os grupos euglicêmico e disglicêmico.

#### **6.7 Métodos de análise bacteriana das fezes**

O processo de coleta, armazenamento e transporte das fezes foi explicado previamente a todos os participantes do estudo (Anexo A), com o intuito de promover adequada coleta e evitar a contaminação. Após o fornecimento do recipiente apropriado para aquisição das amostras fecais em ambiente domiciliar (Figura 8), as mesmas foram trazidas ao laboratório. Estas amostras foram processadas no mesmo dia da entrega no Biovasc e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para, posteriormente, serem encaminhadas ao Laboratório de Genoma do IBRAG.

Figura 8 - Foto do kit de coleta de fezes



Fonte: A Autora, 2018.

Durante o processamento das fezes, extraímos o DNA presente nas amostras fecais pelo kit MoBio Power Soil DNA Isolation (Carlsbad, CA, EUA). Usamos o DNA resultante para amplificar a região de 254 pares de bases correspondente à alça V4 do rRNA 16S com os primers F515 e R806 por PCR (145). Analisamos os arquivos que passam pelo pacote de software Quantitative Insights Into Microbial Ecology (13). Neste software, ocorreu a seleção de OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais), assinatura taxonômica, análise de diversidade alfa e beta e comparações estatísticas para diferenciar a composição da microflora fecal entre os grupos.

O sequenciamento foi conduzido em um instrumento Illumina MiSeq com o kit de reagentes MiSeq de 500 ciclos V2 com leituras pareadas de 250 pb. As leituras em sequência de pares foram desmultiplexadas com o software MiSeq e foram processadas por meio de procedimentos de controle e análise de qualidade seguindo o MiSeq SOP com o software mothur (<http://www.mothur.org>, versão 1.37.0) (146)

Durante o procedimento, emparelhamos as leituras, os erros de sequenciamento foram excluídos e as sequências restantes foram alinhadas a partir de uma base de dados. As sequências quiméricas foram removidas e as que restaram foram taxonomicamente classificadas. Agrupamos as sequências únicas em unidades taxonômicas operacionais

(OTUs) com um corte de identidade de 97%. Todas as leituras foram submetidas ao banco de dados da SRA (*Sequence Read Archive*) sob o número de acesso SRP151928

## 6.8 Métodos de análise do epitélio intestinal

Após jejum de 12 horas, os pacientes foram submetidos a uma endoscopia digestiva alta através do videoendoscópio EG-410HR da Fujinon (FUJI PHOTO OPTICA–JAPÃO) para a coleta de tecido. Tal exame é realizado em decúbito lateral esquerdo, após administração de sedação venosa padrão (midazolam 5 mg e petidina 50 µg, em doses individualizadas).

Examinamos todos os segmentos esofagogástricos segundo o protocolo de endoscopia padronizado e, ao final do exame, realizamos 10 biópsias com pinças jumbo, obrigatoriamente da segunda porção duodenal.

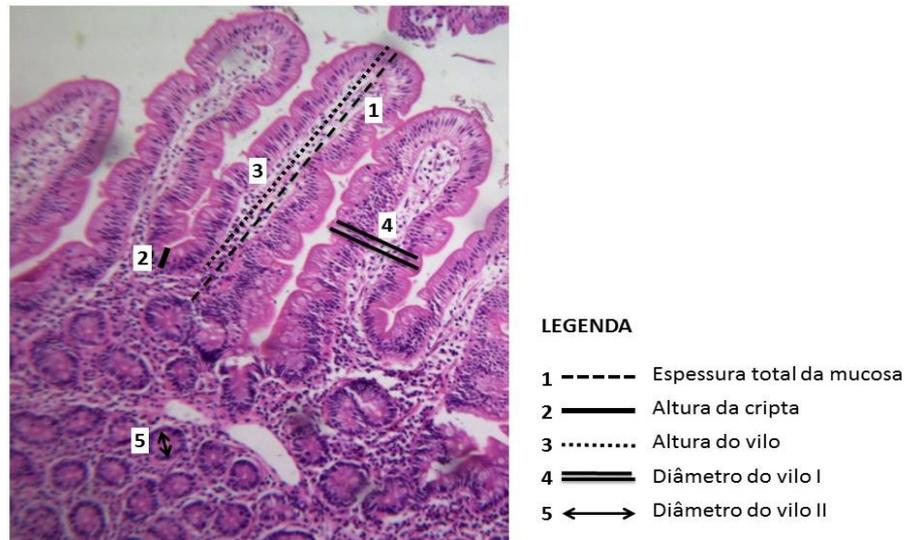
### 6.8.1 Análise histomorfométrica

Uma parte das amostras (três fragmentos) foi enviada ao Laboratório de Anatomia Patológica para análises histomorfométricas. O material conservado no formol a 10% foi processado e emblocado em parafina, sendo cortado conforme os métodos histológicos de rotina. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina.

As lâminas foram fotografadas utilizando-se um microscópio óptico acoplado a uma câmera, com aumento de 100X. Tal procedimento foi realizado no Departamento de Anatomia do IBRAG. As imagens obtidas foram transferidas e processadas em um computador, sendo analisadas através do programa Image J (*NIH-National Institutes of Health*, EUA) para Microsoft Windows (Redmond, Washington, EUA).

No estudo anatomopatológico, os seguintes parâmetros foram avaliados: espessura total do epitélio, altura do vilão intestinal, diâmetro do vilão I, diâmetro do vilão II, altura da cripta e relação vilosidade-cripta (Figura 9).

Figura 9 - Medidas histomorfométricas utilizadas



Fonte: A Autora, 2018.

### 6.8.2 Expressão de proteínas no epitélio intestinal por *Western-Blot* e atividade enzimática

As demais amostras de duodeno foram alocadas em criotubos e mergulhadas imediatamente em nitrogênio líquido. Ao final da endoscopia digestiva e com a liberação do paciente, essas amostras congeladas em nitrogênio líquido eram transferidas para congelamento em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o seu processamento e análise. A expressão de proteínas foi analisada através da técnica de *Western-Blot*, no setor de Biologia Molecular do BIOVASC.

Para a extração de proteínas totais do tecido duodenal, este foi sonificado em tampão de lise (Tris HCl 50 mM pH 7,4, cloreto de sódio 150 mM, pirofosfato de sódio 5 mM, vanadato de sódio 5 mM, Triton X-100 1%, SDS 0,1%, fluoreto de fenil-metano-sulfonil 1 mM e coquetel de inibidor de protease 1x (Roche Diagnostic, Alemanha). Após a homogeneização, o homogenato foi centrifugado por 5 minutos a  $600\times g$ . O *pellet* foi descartado e o sobrenadante transferido para um novo tubo, o qual foi centrifugado por 10 minutos a  $3000\times g$ . O sobrenadante foi coletado e a quantidade total de proteínas em cada amostra foi determinada pelo método de *Pierce* (BCA protein Assay kit, Thermo Scientific Pierce, EUA). Estas amostras foram armazenadas para análises subsequentes.

Na técnica de *Western-Blot* foram analisadas a expressão proteica celular de  $\beta$ -actina, Cadeia Leve da Miosina-2 e Fosfomiosina. Para tal, 50  $\mu$ g de proteínas de cada amostra foram submetidas a uma eletroforese desnaturante, com dodecil sulfato de sódio (SDS), em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10%. Após esta etapa, as proteínas foram transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF), as quais foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 5%, diluído em tampão salino de Tris (TBS) (Bio-Rad, EUA) e, posteriormente, incubadas com os anticorpos primários específicos. As membranas foram lavadas com PBS-Tween 20 a 0,05% e, posteriormente, incubadas com os respectivos anticorpos secundários. A imunodeteção dos *blottings* foi realizada através da reação quimioluminescente do sistema ECL Plus para *western blotting* (Thermo Scientific Pierce; Waltham, Massachusetts, EUA) e detectada através do analisador de imagens Fujifilm LAS-3000 (Fujifilm, *North America Corporation*, EUA).

A densitometria das bandas visualizadas nas imagens resultantes foi analisada através do programa Image J para Microsoft Windows (NIH-*National Institutes of Health*, EUA). Os resultados foram expressos em valores densitométricos arbitrários, a partir da relação entre os valores densitométricos das bandas correspondentes.

Avaliamos ainda a atividade da fosfatase alcalina intestinal no tecido, através do kit específico da Abcam (Alkaline Phosphatase Assay Kit, colorimetric, ab83369, USA). O kit utiliza p-nitrofenilofosfato (pNPP) como substrato de fosfatase que se torna amarelo ( $X_{\max} = 405 \text{ nm}$ ) quando desfosforilado.

### 6.8.3 Expressão Proteica por Imuno-Histoquímica

A expressão proteica da vilina foi quantificada pela técnica de imuno-histoquímica (IH). As lâminas referentes a cada caso foram revistas pelo patologista associado ao projeto. Foram considerados ideais os cortes que apresentavam criptas epiteliais e todas as camadas do tecido intestinal.

Para realização da IH, os blocos foram submetidos a cortes seriados de 3  $\mu$ m de espessura por um micrótomo Leica® e as secções depositadas na superfície de lâminas polarizadas. Em seguida, estes cortes foram fixados em estufa a 60°C por um período mínimo de duas horas. Todo este procedimento foi realizado pelos técnicos da Divisão de Patologia do INCA (DIPAT). O anticorpo utilizado nesta etapa do estudo foi a anti-vilina (clone 3E5G11) -

N-terminal (ABCAM, Cambridge, MA, EUA). A padronização do anticorpo foi feita com cortes de tumor de cólon positivo fornecidos pela DIPAT.

Após avaliação independente de dois patologistas, a diluição e o respectivo tampão de recuperação antigênica que melhor demonstraram a expressão proteica foi: Anti-vilina = 1:1.200 em Tris-EDTA pH=9,0. Para a execução da metodologia da IH, os cortes foram desparafinizados em seis banhos de xilol, desidratados em seis banhos de álcool etílico absoluto e hidratados em água corrente por dois minutos. Para a análise da expressão proteica, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica em banho-maria a 98°C por 30 minutos. Para prosseguir todo o restante da metodologia, foi utilizado o kit de IH Novolink® (Leica, Buffalo Grove, IL, EUA). Após a recuperação antigênica, as lâminas arrefeceram por dez minutos e o tecido foi circundado com caneta hidrofóbica (DAKO®) a 4°C. Após a ciclagem dos tecidos, foi utilizado o tampão de lavagem TBS 1x para evitar seu ressecamento. Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% diluída em água destilada por dez minutos, e posteriormente, o excesso foi retirado e feita lavagem com água destilada. Para finalização desta etapa, foi colocado TBS por mais três etapas de cinco minutos cada. O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com o reagente *Protein Block* do kit NovoLink™ Max Polymer Detection System por cinco minutos e, ao final, feita lavagem novamente com água destilada. A marcação foi realizada com as respectivas diluições já mencionadas, durante período mínimo de 12 horas (“overnight”), a 4°C. Como controles positivo e negativo das reações, foram utilizados cortes do mesmo tecido de câncer de cólon que determinou a padronização. Após este período de incubação, o excesso do anticorpo foi retirado com água destilada e, mais uma vez, foi colocado TBS em três etapas de cinco minutos cada.

A utilização do anticorpo secundário foi feita com o reagente *Post Primary* do kit NovoLink™ Max Polymer Detection System® com duração de trinta minutos. Em seguida, foi realizada nova lavagem com água destilada e TBS em três etapas de cinco minutos cada. Após esta etapa, foi utilizado o *Polymer Detector* com o reagente Novolink Polymer do mesmo kit por mais 30 minutos. Finalmente mais uma lavagem com água destilada e TBS em duas etapas de cinco minutos cada. Após a retirada do excesso de TBS, a revelação foi feita com diaminobenzidina (DAB substrate kit, Leica®), na proporção de 1 ml de diluente para 50 µL do cromógeno, por cinco minutos. Em seguida, a reação foi interrompida por lavagem com água corrente por quatro minutos; as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina por 45 segundos e novamente lavadas com água corrente por dois 5 minutos; desidratadas com

quatro banhos de álcool etílico absoluto; clarificadas com quatro banhos de xilol e, por fim, montadas com bálsamo sob lamínula.

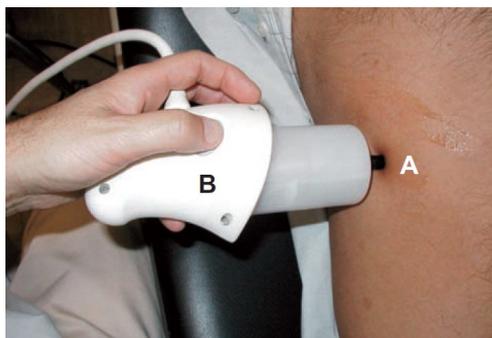
#### 6.8.4 Método de análise do grau de esteatose e fibrose hepáticas

A medida da rigidez hepática foi realizada pela elastografia hepática transitória (EHT) ou FibroScan® (Echosens, Paris, França) na Disciplina de Gastroenterologia da FCM.

O FibroScan® foi utilizado para avaliar a elasticidade tissular em pacientes com doenças hepáticas crônicas e estimar o grau de fibrose (147). Ele é composto por uma sonda, um sistema eletrônico e uma unidade de controle. A sonda contém um vibrador de baixa frequência que, no seu eixo, tem um transdutor de ultrassom com frequência superior a das ecografias correntemente empregadas. O dispositivo é baseado na elastografia transitória unidimensional (1-D), uma técnica que utiliza ondas elásticas (50 Hz) e de ultrassom de baixa frequência (5 MHz), medindo a elasticidade hepática. A velocidade de propagação está diretamente relacionada a elasticidade (148). Este é um método rápido, simples, indolor, reprodutível, não invasivo, capaz de acessar os graus de fibrose em diferentes etiologias de doença hepática crônica.

A elastografia hepática transitória normalmente é realizada através de uma onda mecânica desencadeada pela vibração de um transdutor ultrassônico (Figura 10 - A) ativado pelo médico após acionamento do botão (Figura 10 - B). A sonda de ultrassom é colocada no espaço intercostal, recoberta de gel, na topografia do lobo direito do fígado (149). As medidas são feitas aproximadamente no mesmo espaço intercostal em que é feita a biópsia hepática. O ponto de referência é a interseção entre a linha axilar média e uma linha transversal e paralela aos rebordos costais, ao nível do apêndice xifoide. O paciente permanece em decúbito dorsal, com o braço direito em abdução máxima. Não é necessário o jejum ou exames laboratoriais prévios para a sua realização (149).

Figura 10 - Sonda do FibroScan®



Fonte: Marinho et al. J Port Gastrenterol, 2007(149).

O operador, assistido por imagem ecográfica, localiza uma área do fígado livre de estruturas vasculares e ósseas. O transdutor gera uma onda elástica e mede a velocidade de onda vibratória de baixa frequência e baixa amplitude que é transmitida da pele ao tecido hepático. O aparelho é calibrado para avaliação da elasticidade/rigidez de uma zona da estrutura hepática cuja profundidade se situa entre 25 a 65 mm da pele, com o volume de 1 a 2 cm. Este volume equivale a aproximadamente 1/500 do volume hepático, sendo significativamente maior do que a de um fragmento obtido através da biópsia hepática (1/50.000). A onda elástica propaga-se através do fígado e sua velocidade de propagação é diretamente dependente da rigidez (fibrose) hepática (149). A rigidez é medida em Quilopascals (kPa). Caso a sonda não localize a área hepática ou se a pressão do transdutor na pele for muito elevada ou reduzida, o aparelho rejeita de forma automática a medição.

Os valores do grau de rigidez hepática podem variar de 2,5 a 75,0 kPa e os resultados são imediatamente expostos pelo aparelho. O valor final é a mediana das aquisições válidas, que é considerada como representativa da elasticidade hepática. A taxa de sucesso do exame (TdR) é calculada pelo número de medidas válidas dividido pelo número total de aquisições. Em geral, a TdR reflete a dificuldade para a realização do procedimento e, para que este exame de EHT seja considerado válido, são necessárias 10 aquisições corretas. Outro parâmetro importante é o intervalo interquartil (IQR), que reflete a variabilidade das medidas, o qual não deve exceder 20 a 30% do valor final da mediana. Os valores de IQR inferiores a 20% estão associados à maior acurácia do exame para o diagnóstico de fibrose. (150). Só foram validados exames com 10 medições válidas, com taxa de sucesso superior a 60% (número de medições válidas / número total de medições).

Além da análise do grau de fibrose, o aparelho de FibroScan<sup>®</sup> permite, através do uso de um programa a detecção, a quantificação do grau de esteatose hepática. Este programa denomina-se CAP (*Controlled Attenuation Parameter*). Enquanto o grau de rigidez hepática é medido em quilopascals, o CAP é mensurado através de decibéis por metro, e reflete a diminuição da amplitude do sinal de ultrassom no fígado (151-153). Portanto, um CAP maior reflete um maior grau de esteatose.

O CAP é exibido somente quando a medida da rigidez hepática é válida, pois é computado a partir dos valores de ultrassom utilizados nessa medida. A velocidade de cisalhamento da onda, com estimativa da rigidez hepática e do CAP, permitem a avaliação simultânea tanto do grau de fibrose hepática quanto de esteatose (154, 155). O CAP tem sido capaz de diagnosticar níveis menores de 5% de esteatose. (152, 156).

O FibroScan<sup>®</sup>, apesar de alta reprodutibilidade, apresenta índices de insucesso em torno de 5%. Nesses casos, os resultados da EHT não são válidos ou interpretáveis e não devem ser considerados para avaliação dos pacientes. Dentre as causas de insucesso do exame as mais frequentes são: IQR > 30%; elastogramas inadequados que caracterizam uma propagação errônea das vibrações (ondas A, ondas E e ondas anguladas); número insuficiente de medidas válidas (principalmente em obesos e indivíduos com espaços intercostais estreitos) e, ainda, a experiência do operador (operadores com menos de 500 exames apresentam uma taxa de insucesso superior)(157).

As vantagens do CAP na elastografia hepática transitória são: técnica não invasiva mais amplamente utilizada e validada, alta abrangência de valores, critérios de qualidade bem definidos, boa reprodutibilidade, detecção de rigidez e esteatose da mesma região de interesse, excelência para a exclusão de cirrose, alto valor prognóstico na cirrose, exame de curta duração e indolor, além de ser um método aplicável para a triagem em grandes populações.

A tabela 8 resume as limitações do CAP na elastografia hepática transitória (158).

Tabela 8 - Limitações do CAP na elastografia hepática transitória

<b>Limitações</b>	<b>Explicação</b>
Ascite	As ondas elásticas não viajam através de líquidos
Obesidade	IMC > 30kg/m <sup>2</sup> está associado a falhas. Sonda XL
Hepatite aguda	As alterações nos tecidos na hepatite aguda podem aumentar a rigidez hepática
Hepatite crônica com “flare” de transaminases	TGP > 5 × o LSN pode superestimar a fibrose
Colestase extrahepática	Aumenta a rigidez independentemente do estágio de fibrose
Insuficiência cardíaca congestiva	Congestão hepática pode levar ao falso aumento da rigidez hepática
Espaços intercostais estreitos	Associado a uma menor taxa de sucesso ou falha na aquisição da rigidez. Taxa de falha reduzida com o desenvolvimento da sonda S

Legenda: LSN – limite superior da normalidade.

Fonte: A Autora, 2018.

Nesta pesquisa, a maioria dos exames foi realizado com a sonda M (padrão), onde é possível a medição do grau da esteatose hepática através do CAP. Porém, em alguns indivíduos obesos e com sobrepeso, se fez necessária a utilização da sonda XL (que permite alcance mais profundo, entre 35 e 75 mm da pele) e, nestes casos, a obtenção do grau de esteatose hepática não foi possível. A escolha da sonda é determinada por um software, que tem como base a distância da cápsula da pele ao fígado.

## 7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas pelos programas GraphPad Prism® 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e STATISTICA® 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA). A distribuição gaussiana foi checada e os dados paramétricos e não paramétricos foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão e mediana [1º- 3º quartis], respectivamente.

Para a investigação do objetivo primário do estudo, testamos as correlações lineares entre as variáveis através dos métodos de *Pearson* ou *Spearman* e, para a investigação do objetivo secundário, os testes de ANOVA. Utilizamos o teste *post-hoc* de *Tukey* e *Kruskall-Wallis* e o teste *post-hoc* de *Dunn*, respectivamente, para variáveis que apresentaram distribuição normal ou não normal, nas comparações entre os três grupos e também dentro do mesmo grupo, nos diferentes tempos de estudo.

Visando otimizar os dados obtidos nos períodos pré- e pós-ingestão da refeição padronizada, foram determinadas, para cada indivíduo, além das  $AUC$ , as respectivas equações de regressão linear que modelam a relação entre as variáveis dependentes (biomarcadores inflamatórios) e a variável independente (tempo). As equações obtidas forneceram valores de *slope* (em português, inclinação) e intercepto, os quais definem a relação linear entre a variável dependente (variável testada) e os tempos de coleta. O *slope* representa o grau de inclinação da linha de regressão, podendo ser caracterizado como positivo, negativo ou zero. Quanto maior a magnitude do *slope*, maior a taxa de mudança da variável dependente em função do tempo. O intercepto representa o ponto onde a linha de regressão cruza o eixo da variável dependente. Os valores médios de *slopes* e interceptos também foram comparados entre os grupos. O valor de  $P < 0.05$  foi considerado significativo.

Utilizamos o programa G\*Power 3.1.9.2 (Universität Kiel, Alemanha) para o cálculo do tamanho amostral, indicando que seriam necessários 40 pacientes. Para isso, consideramos o modelo de correlação ponto-bisserial, bicaudal, com um coeficiente de determinação de 0.25, indicando um tamanho de efeito de 0.5, uma potência (probabilidade 1 erro  $\beta$ ) de 0.95 e uma probabilidade de erro  $\alpha$  de 0.05

## **8. ASPECTOS ÉTICOS**

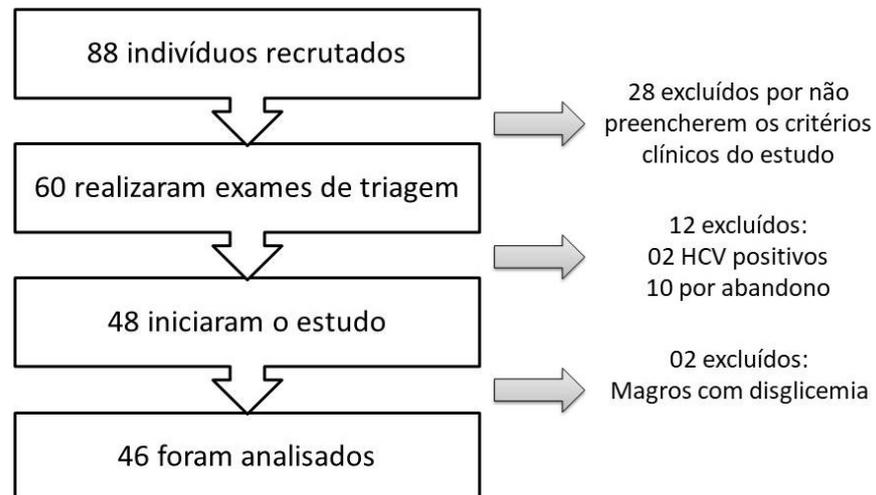
Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE-UERJ), parecer CEP nº 419.676 de 09/10/2013 (Anexo B), e todos os participantes assinaram o TCLE após a completa explicação do propósito da pesquisa e dos procedimentos utilizados. O estudo foi registrado no ClinicalTrials.gov (<https://clinicaltrials.gov/>) NCT03178006.

Ao final do período de investigação, os participantes que apresentaram alterações no exame clínico ou laboratorial foram encaminhados aos ambulatórios específicos para o tratamento de suas condições patológicas.

## 9. RESULTADOS

Recrutamos 88 indivíduos; destes, 48 iniciaram estudo. Excluímos 40 pacientes por não preencherem os critérios de inclusão, por perda de seguimento ou alterações de exames laboratoriais. Dois pacientes (magros e diabéticos) foram também excluídos pela dificuldade na formação deste grupo. Alocamos os 46 participantes restantes nos grupos da seguinte forma: 15 no grupo OBD; 15 no grupo OB; 16 no grupo C (Figura 11).

Figura 11 - Seleção da amostra do estudo



Legenda: HCV: Vírus da hepatite C.  
Fonte: A Autora, 2018.

## **9.1 Comparações entre os grupos – investigação do objetivo secundário**

### **9.1.1 Características antropométricas e bioquímicas**

Dos 46 indivíduos incluídos, com idade de  $38,3 \pm 7,8$  anos e IMC de  $32,63 \pm 5,08$  Kg/m<sup>2</sup>, a maioria da amostra foi composta por mulheres (82,6%).

O grupo OBD apresentou maior idade, CA, CQ, IMC, MM(%), MG (kg) e MG(%) e, no estado basal (jejum), maiores níveis de GJ, IJ, HOMA-IR, HbA1C, IL-6, TNF e leptina; em comparação ao grupo C. Não houve diferença no perfil lipídico dos indivíduos nos três grupos. A tabela 9 resume os dados encontrados.

Tabela 9 - Características clínicas e bioquímicas dos participantes na fase de recrutamento e dosagens basais

	<b>Total (n = 46)</b>	<b>Grupo C (n = 16)</b>	<b>Grupo OB (n = 15)</b>	<b>Grupo OBD (n = 15)</b>	<b>P</b>
<b>Idade (anos)</b>	38,3 ± 7,8	39,2 ± 7,45	33 ± 7,81*	41,69 ± 6,18*	<b>0,02</b>
<b>Mulheres [n, (%)]</b>	38 (82,6%)	10 (62,5%)	13 (86,6%)	15 (100%)	
<b>Peso (kg)</b>	89,42 ± 16,11	71,36 ± 11,25††	98,87 ± 12,76†	93,25 ± 12,07†	<b>0,0008</b>
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	32,63 ± 5,08	25,5 ± 2,34‡‡	34,97 ± 3,42‡	35,22 ± 2,62‡	<b>&lt;0,0001</b>
<b>CA (cm)</b>	104,6 ± 11,39	89,5 ± 7,45‡†	112,1 ± 6,17†	108,4 ± 7,06‡	<b>0,0006</b>
<b>CQ (cm)</b>	115 [110 – 122]	99 [95,75 – 107]*†	116 [113 – 127]†	114,5 [110 – 122]*	<b>0,02</b>
<b>RCQ</b>	0,9 [0,87 – 0,95]	0,88[0,82 – 0,91]	0,94 [0,88 – 0,95]	0,9 [0,88 – 0,99]	0,15
<b>HAS [n, (%)]</b>	10 (21,7%)	0	2 (13,3%)	8 (53,3%)	
<b>GJ (mg/dL)</b>	104 [96,5 – 115,5]	99 [93 – 109]‡	101 [94,75 – 104,5]†	118,5 [113,8 – 152,5]‡†	<b>0,0001</b>
<b>Insulina (pg/ml)</b>	299 [158,5 – 453]	136[89,84 – 276]‡	310,5[228,8 – 390]	451 [319 – 557]‡	<b>0,0013</b>
<b>HOMA-IR</b>	1,79 [0,93 – 3,05]	0,79 [0,51 – 1,77]‡	1,78 [1,43 – 2,46]	3,21 [1,78 – 6,03]‡	<b>0,0011</b>
<b>HbA1c</b>	5,4 [5,3 – 5,9]	5,3 [5,0 – 5,4]‡	5,5 [5,3 – 5,6]	6,1 [6,0 -8,4]‡	<b>&lt;0,0001</b>
<b>CT (mg/dL)</b>	179,2 ± 31,87	183,4 ± 33,94	178,7 ± 38,87	175 ± 23,46	0,34
<b>HDL (mg/dL)</b>	49 [39,50 - 57,75]	51,5 [42 – 59,75]	54 [40 – 62,5]	46 [39 – 49]	0,225
<b>LDL (mg/dL)</b>	108 [93 – 122,5]	106 [93 – 133]	104 [88 – 117,5]	111 [93 – 119]	0,85
<b>TG (mg/dL)</b>	98 [71,75 - 143,8]	96,5 [74,25 – 131,5]	83 [65 – 135,5]	118 [86 – 155]	0,22
<b>BT (mg/dl)</b>	0,45 [0,38 - 0,62]	0,62 [0,48 – 1,01]†	0,43 [0,3 – 0,65]	0,39 [0,33 - 0,44]†	<b>0,0017</b>
<b>TGO (U/l)</b>	17 [13 – 22]	16,5 [12 – 19]	16 [13,5 – 22]	18,5 [13 – 25]	0,64
<b>TGP (U/l)</b>	17,5 [11,75 – 26]	11 [9 – 23,5]*	17 [12 – 24]	24,5 [16,25 – 34,75]*	0,054
<b>GGT (U/l)</b>	33 [23 – 43,5]	23 [13,75 – 38,25]*	26 [19 – 39]	37 [27 – 96]*	<b>0,019</b>
<b>FALC (U/l)</b>	78 [59 – 88]	54 [45 – 72,5]	79 [69 – 82,75]	88,5 [69 – 101]	<b>0,012</b>
<b>Ferritina (µg/ml)</b>	71,6 [31,92–122,1]	41,9 [19,5 – 147,8]	86,9 [25,76 – 121,5]	72,5 [52,36 – 92]	0,98
<b>Adipo (µg/ml)</b>	3,59 [2,7–5,1]	3,27 [2,78 – 3,82]	4,57 [2,86 – 7,22]	3,28 [2,22 - 3,89]	0,27
<b>IL-6 (pg/mL)</b>	2,03 [1,32–3,67]	1,32 [0,94 – 1,74]†*	2,59 [1,52 – 4,45]*	3,53 [2,03 – 4,22]†	<b>0,0054</b>
<b>TNF-α (pg/ml)</b>	0,71 [0,46–0,98]	0,6 [0,36 – 0,85]*	0,64 [0,44 – 0,98]	0,9 [0,66 – 1,15]*	0,055
<b>RBP-4 (µg/ml)</b>	25,57 [22,57–29,82]	26,06 [22,98 – 32,84]	23,89 [21,4 – 26,77]	25,65 [23,41 – 30,23]	0,14
<b>LBP (µg/ml)</b>	23,28 [20,79–27,72]	23,58 [19,43 – 26,67]	23,58 [22,02 – 30,6]	22,98 [20,89 – 27,67]	0,26
<b>Leptina (ng/ml)</b>	32,04 ± 17,68	16,21 ± 10,77‡‡	43,38 ± 16,05‡	39,39 ± 11,91‡	<b>&lt;0,0001</b>
<b>MM (kg)</b>	53,3 [47,38 – 58,3]	48,15 [43,03-56,58]	56,2 [49,8-61,5]	53 [50,9-58,6]	0,06
<b>MM (%)</b>	61,45 [58,88 – 71,13]	74 [71,13-75,48]‡‡	60,1 [56,9-63]‡	59,3[58,4-61,6]‡	<b>&lt;0,0001</b>
<b>MG (kg)</b>	34,15 [20,03 – 40,38]	18,1 [14,93-20,03]‡‡	35,4 [31,7-46,5]‡	37 [31,1-41,8]‡	<b>&lt;0,0001</b>
<b>MG (%)</b>	38,55 [28,88 – 41,13]	25,65[23,75-28,48]††	41,3%[36,63-45,05]†	40,7 [38,1-41,35]†	<b>0,0008</b>

Legenda: Dados expressos como média ± desvio-padrão, mediana [1<sup>o</sup>–3<sup>o</sup> quartis] ou n (%). \*P<0,05. †P<0,01. ‡P<0,001. IMC – índice de massa corporal; CA – circunferência abdominal, CQ – circunferência do quadril; RCQ – relação cintura/quadril; HAS: hipertensão arterial sistêmica; GJ – glicemia em jejum; HOMA-IR – modelo de avaliação da homeostase-resistência à insulina; HbA1c – hemoglobina glicada; CT – colesterol total; HDL – colesterol HDL; LDL – colesterol LDL; TG – triglicerídeos; BT – bilirrubina total; TGO – transpeptidase glutâmico-oxaloacética; TGP – transpeptidase glutâmico-pirúvica; GGT – gama-glutamil transferase; FALC – fosfatase alcalina; Adipo – adiponectina; IL-6 – interleucina-6; TNF-α – fator alfa de necrose tumoral; RBP-4 – proteína ligadora do retinol 4 ; LBP – proteína ligadora de LPS; MM- massa magra; MG: massa gorda. Todas as comparações foram feitas na seguinte ordem: C vs. OBD; C vs. OB; OBD vs. OB.

Fonte: A Autora, 2018.

### 9.1.2 Questionário de frequência alimentar (QFA)

Houve diferença estatística nos seguintes nutrientes: proteína, colesterol, piridoxina, niacina, equivalente de niacina, cobalamina, vitamina D, vitamina A e açúcar em adição (Tabela 10).

Tabela 10 - Questionário de frequência alimentar

	<b>Grupo C</b> <b>(n=15)</b>	<b>Grupo OB</b> <b>(n=12)</b>	<b>Grupo OBD</b> <b>(n=15)</b>	<b>P</b>
<b>Energia (kcal)</b>	4174 [3478-5678]	3438 [2642-5322]	4957 [3440-6598]	0,22
<b>Proteína (g)</b>	139,4 [110,2-209,3]	111,7 [81,9-141,4]*	164,5 [119,2-311,7]*	<b>0,05</b>
<b>Lipídeos (g)</b>	301,7 ± 147,4	218,3 ± 113,3	396,8 ± 256,4	0,12
<b>Saturada (g)</b>	125,7 ± 68,25	81,49 ± 45,34	165,8 ± 108,5	0,08
<b>Monoinsaturada (g)</b>	70,29 ± 31,49	67,37 ± 40,14	111,5 ± 71,35	0,14
<b>Polinsaturada (g)</b>	61,04 [47,68-95,78]	82,3 [34,73-119,3]	61,39 [49,09-116,1]	0,86
<b>Ômega 6</b>	31,31 [19,39-37,25]	30,63 [14,47-46,1]	36,8 [20,43-55,32]	0,58
<b>Ômega 3</b>	2,942 [1,930-4,005]	2,872 [1,381-4,432]	3,947 [2,142-5,067]	0,33
<b>Colesterol (mg)</b>	687,8 [370,2-1350]	290,6 [184,2-441,1]	748,8 [536,1-1310]	0,01
<b>Carboidratos (g)</b>	475,5 [362,2-658,2]	419,7 [322-689,7]	530 [289,1-662,6]	0,87
<b>Fibras (g)</b>	28,30 [35,89-55,01]	37,14 [30,42-52,75]	50,14 [31,72-90,73]	0,33
<b>Cálcio (mg)</b>	1375 [912,1-1834]	1283 [942,1-1651]	2035 [969-2542]	0,16
<b>Magnésio(mg)</b>	405,1 [342-713]	382,3 [305-531,2]	629,9 [341,7-807,9]	0,19
<b>Manganês (mg)</b>	5,567 [4,319-8,624]	5,614 [4,648-6,715]	6,965 [4,836-10,57]	0,50
<b>Fósforo (mg)</b>	2227 [1898-3463]	2024 [1751-2827]	3137 [1631-4442]	0,25
<b>Ferro (mg)</b>	18,55 [15,59-28,03]	16,15 [12,69-21,42]	25,55 [12,96-33,15]	0,22
<b>Sódio (mg)</b>	7401 [3668-11654]	4411 [2845-6629]	5866 [2994-12235]	0,23
<b>Potássio (mg)</b>	4942 [4021-7190]	4148 [3261-6168]	7346 [3657-9877]	0,14
<b>Cobre (mg)</b>	2,682 [2,203-3,534]	2,148 [1,682-2,971]	3,505 [1,854-4,654]	0,20
<b>Zinco (mg)</b>	17,7 [12,16-21,84]	13,11 [10,03-16,11]	19,37 [11,2-29,53]	0,07
<b>Retinol (mcg)</b>	1319 ± 585,4	1319 ± 894,6	2156 ± 1229	0,06
<b>Tiamina (mg)</b>	2,365 [1,855-3,63]	2,095 [1,658-3,136]	3,11 [2,526-4,931]	0,23
<b>Riboflavina (mg)</b>	3,759 [2,822-4,681]	3,191 [2,069-4,48]	4,463 [3,495-6,935]	0,07
<b>Piridoxina (mg)</b>	4,715 [4,151-6,131]	4,105 [3,257-4,894]*	6,491 [5,152-8,268]*	<b>0,04</b>
<b>Niacina (mg)</b>	40,42 [32,41-56,29]#	29,13 [16,87-32,82]*#	37,75 [34,13-74,16]*	<b>0,01</b>
<b>Vitamina C (mg)</b>	259,9 [205,1-395,5]	255,2 [167,8-469,8]	394,1 [270,6-839,2]	0,32
<b>Equiv Niacina (mg)</b>	51,43 [39,85-79,58]	38,38 [24,34-51,01]*	58,02 [44,75-126,2]*	<b>0,03</b>
<b>Cobalamina (mcg)</b>	5,43 [2,697-8,124]	4,058 [2,473-4,663]*	6,592 [3,266-15,14]*	<b>0,04</b>
<b>Equiv Folato (mcg)</b>	463,9 [352,4-756,6]	369,4 [289,2-614,8]	646,2 [310,8-883,6]	0,34
<b>Vitamina D (mcg)</b>	5,269 ± 3,254	3,565 ± 2,031*	10,54 ± 7,397*	<b>0,005</b>
<b>Vitamina E (mg)</b>	9,302 [7,927-12,04]	8,176 [4,74-14,84]	14,75 [11,79-22,77]	0,02
<b>Gordura trans (g)</b>	15,83 ± 11,77	27,23 ± 20,43	32,25 ± 24,47	0,16
<b>Sódio de Adição (mg)</b>	1807 [1438-2763]	1612 [1166-2041]	2280 [1366-3624]	0,20
<b>Selênio (mcg)</b>	172,6 [113,8-290,4]	110,5 [82,36-181,7]	230,5 [110,9-442,8]	0,06
<b>Vitamina A (mcg)</b>	1970[1376-2522]#	1244[866,2-2777]*	3271[2316-3737]*#	<b>0,005</b>
<b>Açúcar Total (g)</b>	205,9[169,3-267,3]	155,1[110,6-309,8]	212,3[107,6-274,9]	0,63
<b>Açúcar de Adição (g)</b>	171[119,5-248,3]*	105,6[55,65-183,4]*	61,04[24,73-132,7]	<b>0,02</b>

Fonte: A Autora, 2018.

### 9.1.3 Análises séricas

Durante o teste com o Nutridrink<sup>®</sup>, realizamos uma comparação ponto a ponto das variáveis medidas de forma seriada antes e após a ingesta da refeição padrão (glicose, insulina, LPS, GLP-1 e grelina) e, nesta análise, os grupos apresentaram diferenças nos seguintes parâmetros: glicose nos tempos basal, 30 e 60 min, insulina basal e grelina basal. O GLP-1 e o LPS não obtiveram significância estatística (Tabela 11).

Tabela 11 - Comparação das dosagens bioquímicas entre os grupos

	<b>Grupo C</b> (n = 16)	<b>Grupo OB</b> (n = 15)	<b>Grupo OBD</b> (n = 15)	<b>P</b>
<b>Glicose 0 (mg/dL)</b>	99 [93 – 109]‡	101 [94,75 – 104,5]†	118,5 [113,8 – 152,5]‡†	<b>0,0001</b>
<b>Glicose 30 (mg/dL)</b>	111 [101 – 120,5]*	110,5 [96 – 119,5]†	137 [118 – 196,8]*†	<b>0,0016</b>
<b>Glicose 60 (mg/dL)</b>	119 [102,5 – 128]‡	108 [98 – 120]‡	156,5 [133,3 – 217,8]‡‡	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>Insulina 0 (pg/ml)</b>	136 [89,84 – 276]‡	310,5 [228,8 – 390]	451 [319 – 557]‡	<b>0,0013</b>
<b>Insulina 30 (pg/ml)</b>	548 [385,5 – 1133]	879 [604 – 1388]	1215 [878 – 2048]	0,1
<b>Insulina 60 (pg/ml)</b>	862 [695 – 1387]	1234 [930,8 – 1936]	1680 [1215 – 1864]	0,07
<b>GLP1 0 (pM/dl)</b>	0,63 [0,53 – 0,94]	0,59 [0,5 – 0,73]	0,84 [0,63 – 0,89]	0,13
<b>GLP1 30 (pM/dl)</b>	1,5 [0,97 – 2,04]	1,99 [1,04 – 2,18]	1,19 [0,84 – 2,53]	0,79
<b>GLP1 60 (pM/dl)</b>	0,99 [0,79 – 1,68]	1,36 [1,0 – 2,02]	1,39 [1,19 – 1,99]	0,22
<b>LPS 0 (EU/ml)</b>	1,02 [0,47 – 1,47]	1,17 [0,91 – 1,5]	1,1 [0,53 – 1,65]	0,6
<b>LPS 30 (EU/ml)</b>	0,84 [0,55 – 1,13]	0,89 [0,67 – 1,08]	0,97 [0,58 – 1,43]	0,47
<b>LPS 60 (EU/ml)</b>	0,79 [0,5 – 1,0]	0,88 [0,73 – 1,33]	0,75 [0,51 – 1,31]	0,57
<b>Grelina 0 (pg/ml)</b>	73,71 [40,67 – 125]*	69,79 [45,28 – 96,69]	41,73 [27,75 – 56,48]*	<b>0,02</b>
<b>Grelina 30 (pg/ml)</b>	28,83 [20,3 – 78,69]	52,16 [15,77 – 91,46]	23,66 [12,69 – 37,72]	0,31
<b>Grelina 60 (pg/ml)</b>	39,97 [21,12 – 48,12]	26,39 [15,9 – 52,72]	17,78 [10,88 – 36,74]	0,09

Legenda: Dados expressos como média ± desvio-padrão e mediana [1<sup>o</sup>–3<sup>o</sup> quartis]. \*P<0,05. †P<0,01. ‡P<0,001

Fonte: A Autora, 2018.

Além disso, os grupos C, OB e OBD foram comparados em relação às AUC, aos *slopes* e interceptos de cada variável laboratorial. As seguintes diferenças foram observadas: GJ<sub>AUC</sub> (6480 [5925 – 7095] vs. 6488 [5959 – 6773] vs. 8265 [7286 – 11336] mg/dL p<0,0001) e Insulina<sub>AUC</sub> (30915 [26481 – 51750] vs. 67395 [52515 – 100110] p<0,05) foram ambas maiores no grupo OBD em comparação aos grupos C e OB (Tabela 12). Quanto ao

intercepto, as seguintes diferenças foram observadas:  $GJ_{intercepto}$  (103 [95,84 – 106] vs. 101,5 [96,12 – 106,1] vs. 120,1 [111,5 – 148,3],  $p=0,0003$ ) mg/dL,  $insulina_{intercepto}$  (224,7 [99,26 – 339,1] vs. 408,6 [225,6 – 449] vs. 531,8 [376,5 – 868,5],  $p<0,01$ ) pg/ml e  $grelina_{intercepto}$  (58,93 [39,25 – 119] vs. 67,13 [41,24 – 91,32] vs. 44,4 [27,9 – 56,03] pg/ml,  $p<0,05$ ) (Tabela 13). Não houve outras diferenças dessa análise no *slope* para os marcadores bioquímicos (Tabela 14).

Tabela 12 - Análise comparativa da AUC das variáveis bioquímicas entre os grupos

	Grupo C (n = 16)	Grupo OB (n = 15)	Grupo OBD (n = 15)	P
<b>Glicose (mg/dl)</b>	6480 [5925-7095] ‡	6488 [5959-6773] ‡	8265 [7286-11336] ‡‡	<b>0,0001</b>
<b>Insulina (pg/ml)</b>	30915 [26481-51750]*	60765 [34624-69799]	67395 [52515-100110]*	<b>0,03</b>
<b>GLP1 (pM/dl)</b>	73,89 [55,23-100]	86,05 [57,92-115,2]	70,91 [54,68-128,7]	0,83
<b>LPS (EU/ml)</b>	51,76 ± 17,20	61,92 ± 17,46	62,27 ± 29,02	0,31
<b>Grelina (pg/ml)</b>	2521 [1821 – 4600]	2711 [1465 – 4990]	1798 [1058 – 2702]	0,13

Legenda: Dados expressos como média ± desvio-padrão, mediana [1°–3° quartis]. \*P<0,05. †P<0,01. ‡P<0,001

Fonte: A Autora, 2018.

Tabela 13 - Análise comparativa dos interceptos das variáveis bioquímicas entre os grupos

	Grupo C (n = 16)	Grupo OB (n = 15)	Grupo OBD (n = 15)	P
<b>Glicose (mg/dl)</b>	103 [95,84-106]‡	101,5[96,12-106,1]†	120,1[111,5-148,3]†‡	<b>0,0003</b>
<b>Insulina (pg/ml)</b>	224.7 [99.26-339.1]†	408.6 [225.6-449]	531.8 [376.5-868.5]†	<b>0,0046</b>
<b>GLP1 (pM/dl)</b>	0,007[0,005-0,01]	0,013[0,006-0,02]	0,013 [0,005-0,018]	0,33
<b>LPS (EU/ml)</b>	0,98± 0,4086	1,14 ± 0,4685	1,121 ± 0,5246	0,59
<b>Grelina (pg/ml)</b>	58,93 [39,25 – 119]	67,13 [41,24 – 91,32]*	44,4 [27,9 – 56,03]*	<b>0,02</b>

Legenda: Dados expressos como média ± desvio-padrão, mediana [1°–3° quartis]. \*P<0,05. †P<0,01. ‡P<0,001

Fonte: A Autora, 2018.

Tabela 14 - Análise comparativa do *slope* das variáveis bioquímicas entre os grupos

	Grupo C (n = 16)	Grupo OB (n = 15)	Grupo OBD (n = 15)	P
<b>Glicose (mg/dl)</b>	2,0 [-0,44-3,43]	4,45[2,47-8,12]	1,54[1,06-3,19]	0,06
<b>Insulina (pg/ml)</b>	0,07 [0,05-0,12]	0,06 [0,03-0,11]	0,05 [0,04-0,09]	0,28
<b>GLP1 (pM/dl)</b>	139,5[49,78-176,3]	77,04[49,94-151,8]	75,28 [44,88-117,2]	0,43
<b>LPS (EU/ml)</b>	-74,07[-380,8 - 807]	-117[-78,1 – 46,31]	-101,4 [-379,7 – 174,9]	0,9
<b>Grelina (pg/ml)</b>	-1,29 [-4,99 – (-0,85)]	-1,69 [-2,34 – (-0,91)]	-2,22 [-3,25 – (-1,56)]	0,76

Legenda: Dados expressos como média ± desvio-padrão, mediana [1°–3° quartis].

Fonte: A Autora, 2018.

Além das comparações das variáveis descritas acima entre os grupos, realizamos uma comparação dessas variáveis intragrupos. A tabela 15 a seguir resume as análises das variáveis bioquímicas dentro do mesmo grupo.

Tabela 15 - Análise comparativa das variáveis bioquímicas dentro do mesmo grupo

	Basal (0 min)	30 min	60 min	p
<b>C (n =16)</b>				
<b>Glicose (mg/dl)</b>	99 [93-109]*†	111 [101-120,5]*	119 [102,5-128]†	<b>0,0042</b>
<b>Insulina (pg/ml)</b>	136 [89,84-276]‡‡	548 [385,5-1133]‡	862[695-1387]‡	<b>&lt;0,0001</b>
<b>GLP1 (pM/dl)</b>	0,62 [0,53-0,94]‡‡	1,5 [0,97-2,04]‡	0,99 [0,79-1,68]‡	<b>&lt;0,0001</b>
<b>LPS (EU/ml)</b>	1,01 ± 0,46	0,82 ± 0,31	0,78 ± 0,32	0,0523
<b>Grelina (pg/ml)</b>	73,71 [40,67 – 125]†‡	28,83 [20,3 – 78,69]†	39,97 [21,12 – 48,12]‡	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>OB (n =15)</b>				
<b>Glicose (mg/dl)</b>	101 [94,75-104,5]†	110,5 [96-119,5]	108mg/dl [98-120]†	<b>0,0057</b>
<b>Insulina (pg/ml)</b>	310,5 [228,8-390]†‡	879 [604-1388]†	1234 [930,8-1936]‡	<b>&lt;0,0001</b>
<b>GLP1 (pM/dl)</b>	0,59 [0,5-0,73]‡‡	1,99 [1,04-2,18]‡	1,36 [1,0-2,02]‡	<b>&lt;0,0001</b>
<b>LPS (EU/ml)</b>	1,17 [0,91 – 1,5]*	0,9 [0,67 – 1,08]*	0,88 [0,74 – 1,33]	<b>0,04</b>
<b>Grelina (pg/ml)</b>	69,79 [45,28 – 96,69]‡	52,16 [15,77 – 91,46]	26,39 [15,9 – 52,72]‡	<b>0,0012</b>
<b>OBD (n =15)</b>				
<b>Glicose (mg/dl)</b>	118,5 [113,8-152,5]‡	137 [118-196,8]*	156,5[133,3-217,8]‡*	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Insulina (pg/ml)</b>	451[319-557]*‡	1215[878-2048]*	1680 [1215-1864]‡	<b>&lt;0,0001</b>
<b>GLP1 (pM/dl)</b>	0,84 [0,63-0,89]‡	1,19 [0,84-2,53]	1,39 [1,19-1,99]‡	<b>0,0006</b>
<b>LPS (EU/ml)</b>	1,10 ± 0,55	1,05 ± 0,57	0,93 ± 0,49	0,16
<b>Grelina (pg/ml)</b>	41,73 [27,75 – 56,48]†	23,66 [12,69 – 37,72]	17,78 [10,88 – 36,74]†	<b>0,0016</b>

Legenda: Dados expressos como média ± desvio-padrão, mediana [1<sup>o</sup>-3<sup>o</sup> quartis] . \*P<0,05. †P<0,01. ‡P<0,001

Fonte: A Autora, 2018.

#### 9.1.4 Análises moleculares

Em relação às proteínas expressas no epitélio intestinal por imunohistoquímica e *Western-Blot*, não houve diferença estatisticamente significativa nos três grupos de pacientes (tabela 16).

Tabela 16 - Análise das proteínas expressas no epitélio duodenal entre os grupos

	Total	Grupo C	Grupo OB	Grupo OBD	P
<b>Vilina (IHQ)</b>	(n = 44) 0,82 [0,74 - 0,86]	(n = 14) 0,83 [0,75 - 0,89]	(n = 15) 0,81 [0,74-0,86]	(n = 15) 0,81 [0,74 - 0,86]	0,72
<b>Miosina (WB)</b>	(n = 24) 0,19 [0,08 - 0,43]	(n = 09) 0,25 [0,05 - 0,45]	(n = 09) 0,19 [0,09-0,38]	(n = 06) 0,15 [0,08-0,33]	0,86
<b>P-miosina (WB)</b>	(n = 30) 0,15 [0,04-0,46]	(n = 10) 0,18 [0,03-0,62]	(n = 11) 0,25 [0,04-0,51]	(n = 09) 0,09 [0,05-0,25]	0,56
<b>P-miosina/miosina (WB)</b>	(n = 26) 0,76 [0,42-1,41]	(n = 10) 0,65[0,41-1,11]	(n = 9) 1,05 [0,39-1,52]	(n = 7) 0,93 [0,42-1,49]	0,75
<b>β-actina (WB)</b>	(n = 41) 0,11 [0,07-0,23]	(n = 13) 0,20 [0,08 - 0,43]	(n = 15) 0,11 [0,06-0,30]	(n = 13) 0,10 [0,04 - 0,15]	0,16

Legenda: IHQ-imunohistoquímica. WB-western-blot. n- número de pacientes. P-miosina-fosfomiosina

Fonte: A Autora, 2018.

Já no ensaio enzimático da atividade da fosfatase alcalina intestinal, observamos diferença entre os três grupos C, OBD e OB (respectivamente, 0,75 [± 0,23] U/ml vs. 0,43 [± 0,31] U/ml vs. 0,56 [± 0,27] U/ml]; p = 0,02). No entanto, na análise *post-hoc*, essa diferença foi relevante somente para os grupos C vs. OBD (P < 0.05; tabela 17, figura 12).

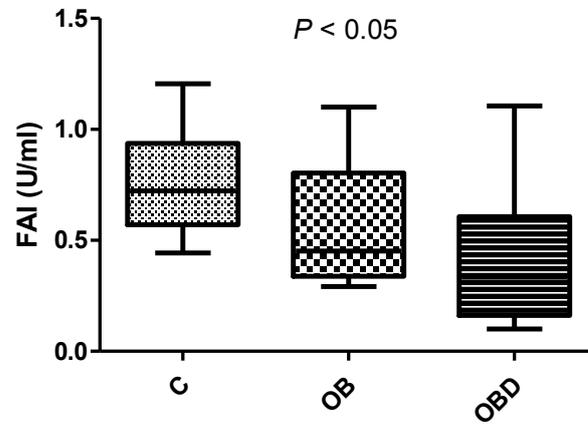
Tabela 17 - Análise enzimática

Fosfatase alcalina intestinal (U/ml)	Total (n = 36)	Grupo C* (n = 12)	Grupo OB (n = 12)	Grupo OBD* (n = 12)	P
	0,58 ± 0,29	0,75 ± 0,23	0,56 ± 0,27	0,43 ± 0,31	<b>0,02</b>

Legenda: Dados expressos como média ± desvio-padrão, mediana [1°-3° quartis] . \*P<0,05.

Fonte: A Autora, 2018.

Figura 12 - Atividade da fosfatase alcalina intestinal entre os grupos



Fonte: A Autora, 2018.

#### 9.1.5 Análises histomorfométricas

Em relação à espessura total do epitélio, não houve diferença entre os grupos C, OB e OBD (respectivamente: 14,45 [12,21-17,2] vs. 13,07 [11,18-17,20] vs. 13,76 [11,18-15,48] ;  $P = 0.5302$ ), assim como na altura do vilão (respectivamente: 12,04 [10,75-15,91] vs. 12,04 [9,460-14,62] vs. 12,04 [9,290-13,76];  $P = 0.5369$ ). Nos quesitos diâmetros dos vilos I e II, assim como altura da cripta, também não encontramos diferenças entre os grupos C, OB, OB e OBD. Na relação vilão/cripta, houve distribuição normal para os três grupos, mas também não observamos diferença estatística entre os grupos C, OB e OBD (respectivamente:  $10,81 \pm 2,832$  vs.  $9,379 \pm 4,539$  vs.  $8,333 \pm 3,117$ ;  $P = 0.2095$ ).

O resumo desses achados se encontra na tabela 18, a seguir.

Tabela 18 - Análise histomorfométrica

	<b>Total (n = 43)</b>	<b>Grupo C (n = 12)</b>	<b>Grupo OB (n = 12)</b>	<b>Grupo OBD (n = 12)</b>	<b>P</b>
<b>ET(μm)</b>	13,76 [11,18-17,20]	14,45 [12,21-17,2]	13,07 [11,18-17,20]	13,76 [11,18-15,48]	0,53
<b>AV(μm)</b>	12,04 [9,46-14,62]	12,04 [10,75-15,9]	12,04 [9,460-14,62]	12,04 [9,290-13,76]	0,53
<b>DV I(μm)</b>	3,96 [3,44-4,30]	3,78 [3,44-4,73]	3,78 [3,44-4,30]	4,13 [3,44-5,16]	0,51
<b>DV II(μm)</b>	1,03 [1,03-1,38]	1,03 [1,03-1,20]	1,03 [1,03-1,38]	1,20 [1,03-1,72]	0,25
<b>AC(μm)</b>	1,38 [0,86-1,72]	1,03 [0,860-1,72]	1,38 [0,860-1,89]	1,55 [1,03-1,72]	0,78
<b>V/C(μm)</b>	9,47±3,62	10,8 ± 2,83	9,38 ± 4,54	8,33 ± 3,12	0,20

Legenda: ET = espessura total; AV = altura do vilão; DV I = diâmetro do vilão I; DV II = diâmetro do vilão II; AC = altura da cripta; V/C = relação vilosidade/cripta.

Fonte: A Autora, 2018.

### 9.1.6 Elastografia hepática

Em relação ao grau de rigidez hepática, observamos diferença entre os grupos C, OB e OBD (respectivamente, 4,9 [3,9-5,2] vs. 5,35 [3,67-9,47] vs. 6,1 [5,5-7,8],  $P = 0.03$ ). A análise *post-hoc* mostrou que essa diferença foi relevante entre os grupos C vs. OBD ( $p < 0.05$ ). No quesito esteatose, houve diferença entre os grupos C, OB e OBD (respectivamente, 185 [155-203] dB/m vs. 218 [181 – 267,8] dB/m vs. 228 [202,5–282,5] dB/m,  $P = < 0.05$ ). No entanto, na análise *post-hoc*, a diferença foi relevante somente entre os grupos C vs. OBD ( $p < 0.05$ ; tabela 19).

Tabela 19 - Análise FibroScan® entre os grupos

	<b>Grupo C (n = 16)</b>	<b>Grupo OB (n = 15)</b>	<b>Grupo OBD (n = 15)</b>	<b>P</b>
<b>Fibrose (kPa)</b>	4,9 [3,9-5,2]*	5,35 [3,67-9,47]	6,1 [5,5-7,8]*	<b>0,03</b>
<b>CAP (dB/m)</b>	185 [155-203]*	218 [181 – 267,8]	228 [202,5–282,5]*	<b>0,02</b>

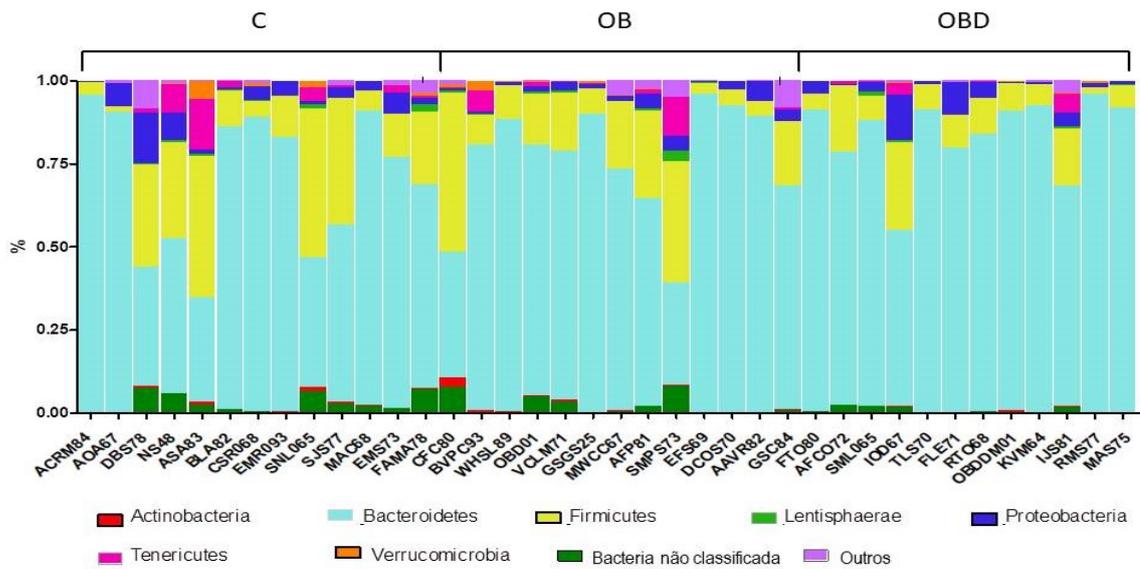
Legenda: Dados expressos como média ± desvio-padrão, mediana [1º–3º quartis] . \* $P < 0,05$ .

Fonte: A Autora, 2018.

### 9.1.7 Microbiota intestinal

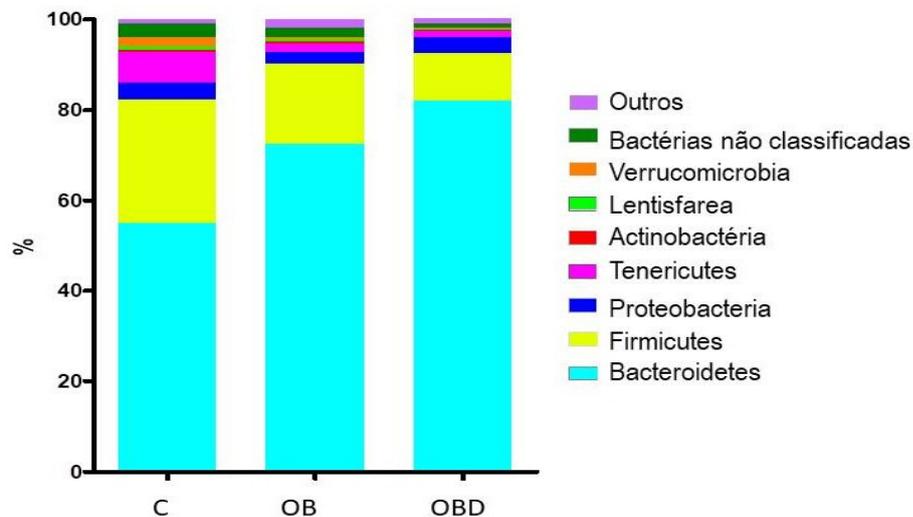
Em relação à microbiota intestinal, houve grande variabilidade individual em todos os grupos, conforme demonstrado nas figuras 13 e 14. Os filos predominantes foram *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, seguidos pela *Proteobacteria*.

Figura 13 - Variação interindividual da microbiota intestinal por filos bacterianos



Fonte: A Autora, 2018.

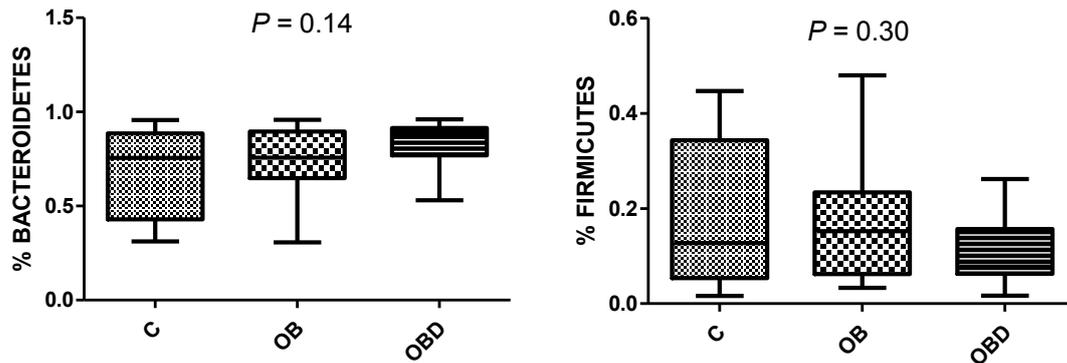
Figura 14 - Variação entre os grupos da microbiota intestinal por filos bacterianos



Fonte: A Autora, 2018.

No geral, não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre o filo *Firmicutes* e *Bacteroidetes* nos três grupos analisados (figura 15).

Figura 15. Frequência dos filios *Bacteroidetes* e *Firmicutes* entre os grupos de estudo



Fonte: O Autor, 2018

Porém, quando analisamos a abundância de Otus específicas (unidade taxonômica operacional; conforme Anexo C), observamos algumas diferenças, na dependência da espécie estudada, de acordo com a tabela a seguir (tabela 20).

Tabela 20 - Comparação da abundância de Otus entre os grupos especificados

OTU	Grupo C (n)	Grupo OB (n)	Grupo OBD (n)	LDA	P
41 (T)	832	702	1153	3,1	<b>0,004</b>
55 (B)	5828	121	480	3,8	<b>0,02</b>
74 (F)	1477	209	491	3,2	<b>0,02</b>
140 (P)	622	297	130	2,9	<b>0,03</b>
145 (P)	1025	1	45	3,1	<b>0,009</b>
155 (F)	426	17	65	2,7	<b>0,02</b>
213 (F)	25	160	38	2,3	<b>0,004</b>

Legenda: OTU: unidade taxonômica operacional; LDA: discriminante linear do tamanho; T: Filo Tenericutes; B: Filo *Bacteroidetes*; P: filo Proteobacteria; F: filo *Firmicutes*

Fonte: A Autora, 2018.

## 9.2 Correlações – investigação do objetivo primário

Após a análise dos resultados comparando os três grupos de indivíduos, iniciamos nossa investigação do objetivo primário do estudo e, com esse intuito, avaliamos a correlação entre os marcadores séricos inflamatórios, a morfologia epitelial intestinal, o grau de esteatose/fibrose hepáticas e a microbiota na amostra total de pacientes estudados.

### 9.2.1 Marcadores séricos inflamatórios

Essa análise contemplou a correlação das variáveis LPS, LBP, IL-6, TNF, RBP-4 e ferritina com todas as variáveis do estudo. As correlações em negrito mostraram nível de significância estatística e estão destacadas na tabela 21.

Tabela 21- Correlações de marcadores séricos inflamatórios com antropometria e bioquímica nos indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose

	CA (cm)	RCQ	Peso (Kg)	MG (Kg)	TGP (U/ml)	INS 30 (pg/ml)	Ferritina (ng/ml)	Leptina (ng/ml)
LPS 0 (EU/ml)	0,28	-0,05	<b>0,32*</b>	0,24	-0,07	0,16	<b>0,43*</b>	0,43
LPS 60 (EU/ml)	<b>0,31**</b>	0,14	<b>0,29**</b>	0,26	0,16	0,02	0,33	0,32
LPS <sub>AUC</sub>	<b>0,32**</b>	-0,01	<b>0,28**</b>	<b>0,30**</b>	-0,06	0,04	<b>0,37*</b>	0,23
LBP (µg/ml)	0,24	<b>0,37*</b>	0,03	0,11	-0,30	-0,29	-0,32	<b>0,42**</b>
IL-6 (pg/ml)	<b>0,47*</b>	0,17	<b>0,34*</b>	<b>0,47*</b>	0,11	0,12	-0,08	<b>0,57**</b>
TNF-α (pg/ml)	<b>0,35*</b>	<b>0,34**</b>	<b>0,30**</b>	0,26	0,29	0,15	0,28	<b>0,30**</b>
RBP-4 (µg/ml)	-0,07	-0,13	0,06	0,03	<b>0,47*</b>	<b>0,36*</b>	0,34	0,18
Ferritina(ng/ml)	0,29	0,05	<b>0,37*</b>	0,33	<b>0,49*</b>	0,07	-	0,13

Legenda: \*P<0,05. \*\*P<0,01 \*\*\*P<0,001

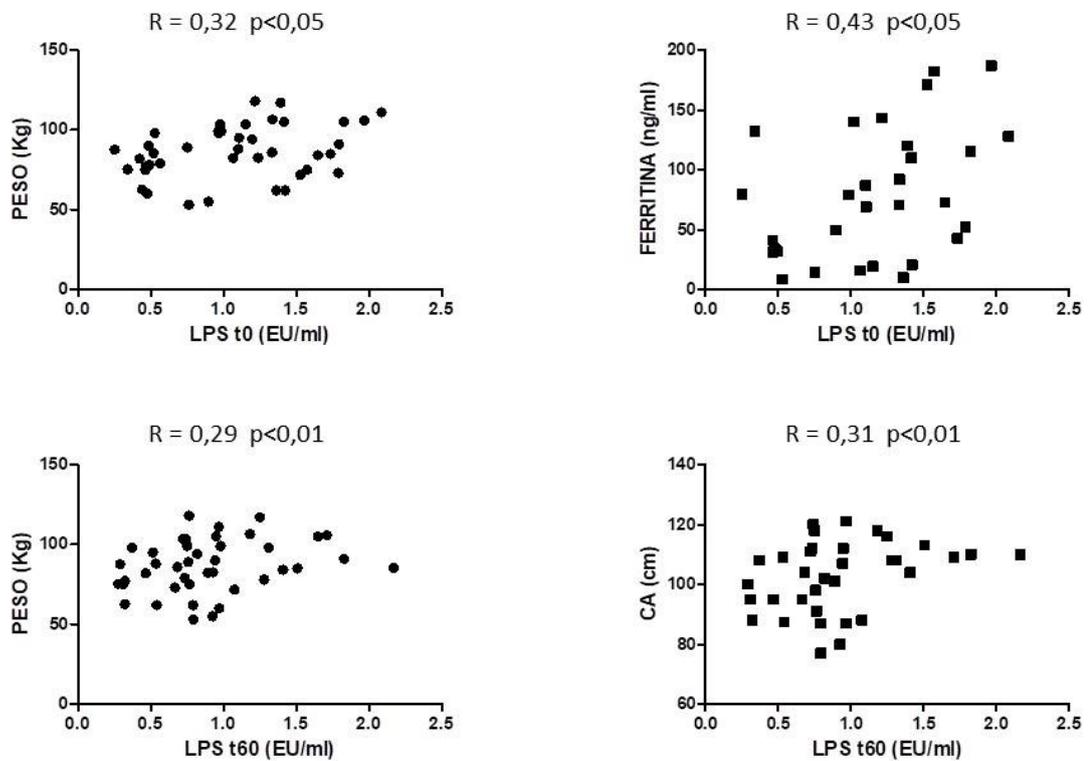
CA: circunferência abdominal; RCQ: relação cintura-quadril; MM: massa magra; MG: massa gorda; INS 30: insulina no tempo 30 min; LPS 0: Lipopolissacarídeo no tempo 0; LPS 60: Lipopolissacarídeo no tempo 60 min; LPS<sub>AUC</sub>: Lipopolissacarídeo na área sob a curva; LBP: proteína ligante de LPS; IL-6: interleucina 6; TNF: Fator de necrose tumoral; RBP-4: proteína ligante do retinol-4.

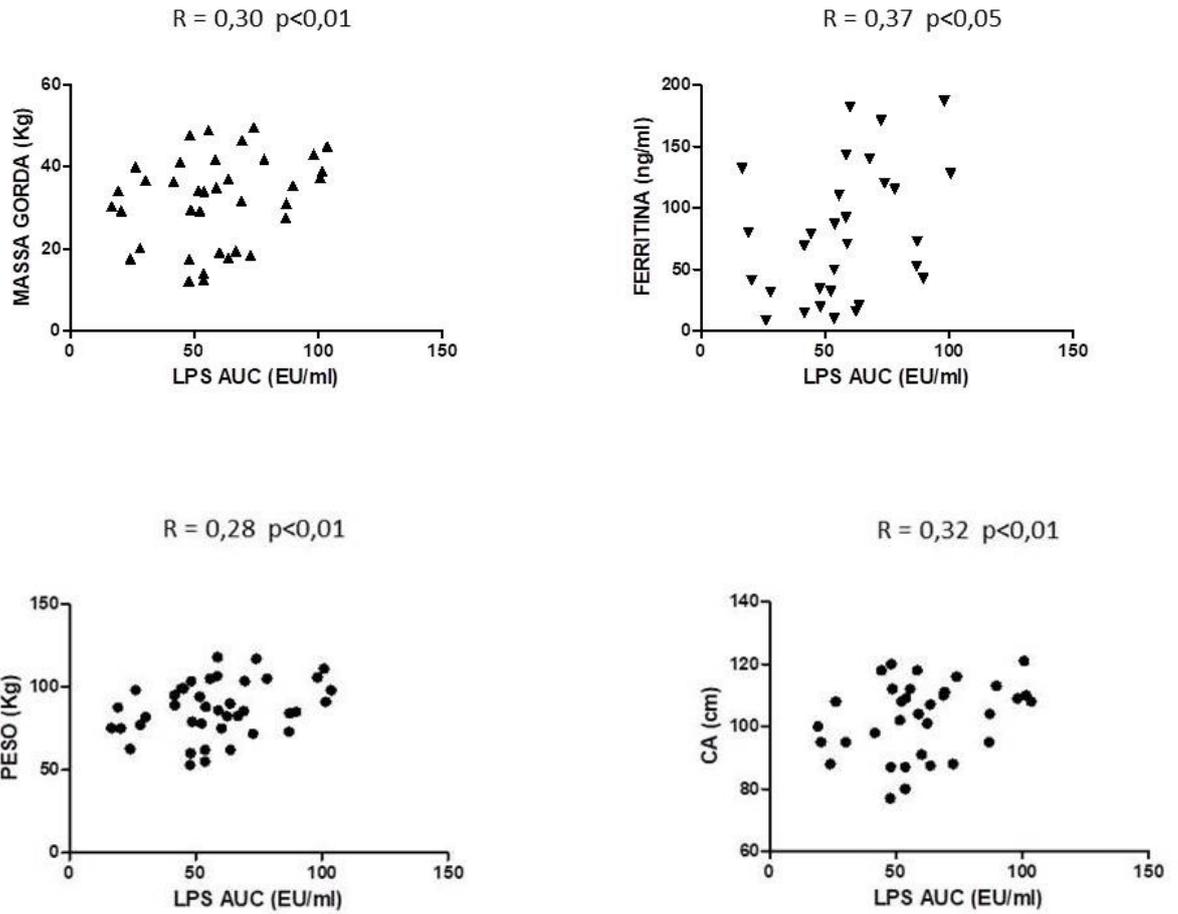
Fonte: A Autora, 2018.

Como podemos observar, o LPS se correlacionou diretamente com o peso, circunferência abdominal, a relação cintura-quadril, a massa gorda e a ferritina (figura 16). O LBP demonstrou uma associação direta com a relação cintura-quadril e leptina (figura 17).

Os demais marcadores inflamatórios (IL-6, TNF-, RBP-4 e ferritina) se correlacionaram positivamente com a relação cintura-quadril, o peso, a massa gorda, a TGP, insulina no tempo 30 min e leptina.

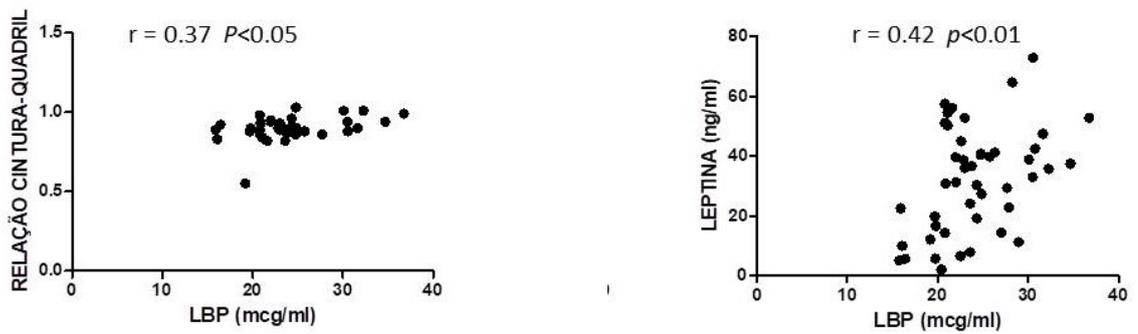
Figura 16 - Correlações lineares do LPS e do LPS<sub>AUC</sub> com marcadores antropométricos e ferritina





Fonte: A Autora, 2018.

Figura 17 - Correlação linear do LBP com RCQ e leptina



Fonte: A Autora, 2018.

### 9.2.2 Correlações do epitélio intestinal

Comparamos as proteínas presentes no epitélio intestinal com todas as variáveis do estudo. Os resultados com relevância estatística estão agrupados na tabela 22.

Tabela 22 - Correlações das proteínas estruturais em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose

	<b>P-miosina (U/ml)</b>	<b><math>\beta</math>-actina (U/ml)</b>	<b>Vilina (U/ml)</b>
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	-0,14	<b>-0,32*</b>	0,01
<b>HbA1c (%)</b>	-0,24	-0,24	0,05
<b>GGT (U/ml)</b>	-0,14	<b>-0,34*</b>	0,04
<b>P-miosina (U/ml)</b>	-	<b>0,37*</b>	<b>-0,42*</b>
<b><math>\beta</math>-actina (U/ml)</b>	<b>0,37*</b>	-	<b>-0,54***</b>
<b>ET (<math>\mu</math>m)</b>	0,06	0,18	<b>-0,34*</b>
<b>AV (<math>\mu</math>m)</b>	0,15	0,15	<b>-0,34*</b>
<b>Vilina (U/ml)</b>	<b>-0,42*</b>	<b>-0,54***</b>	-
<b>GLIC 0 (mg/dL)</b>	-0,22	<b>-0,49**</b>	0,17
<b>INS 0 (pg/ml)</b>	-0,01	<b>-0,49**</b>	0,01
<b>HOMA IR</b>	-0,03	<b>-0,55***</b>	0,06

Legenda: \*P<0,05. \*\*P<0,01 \*\*\*P<0,001

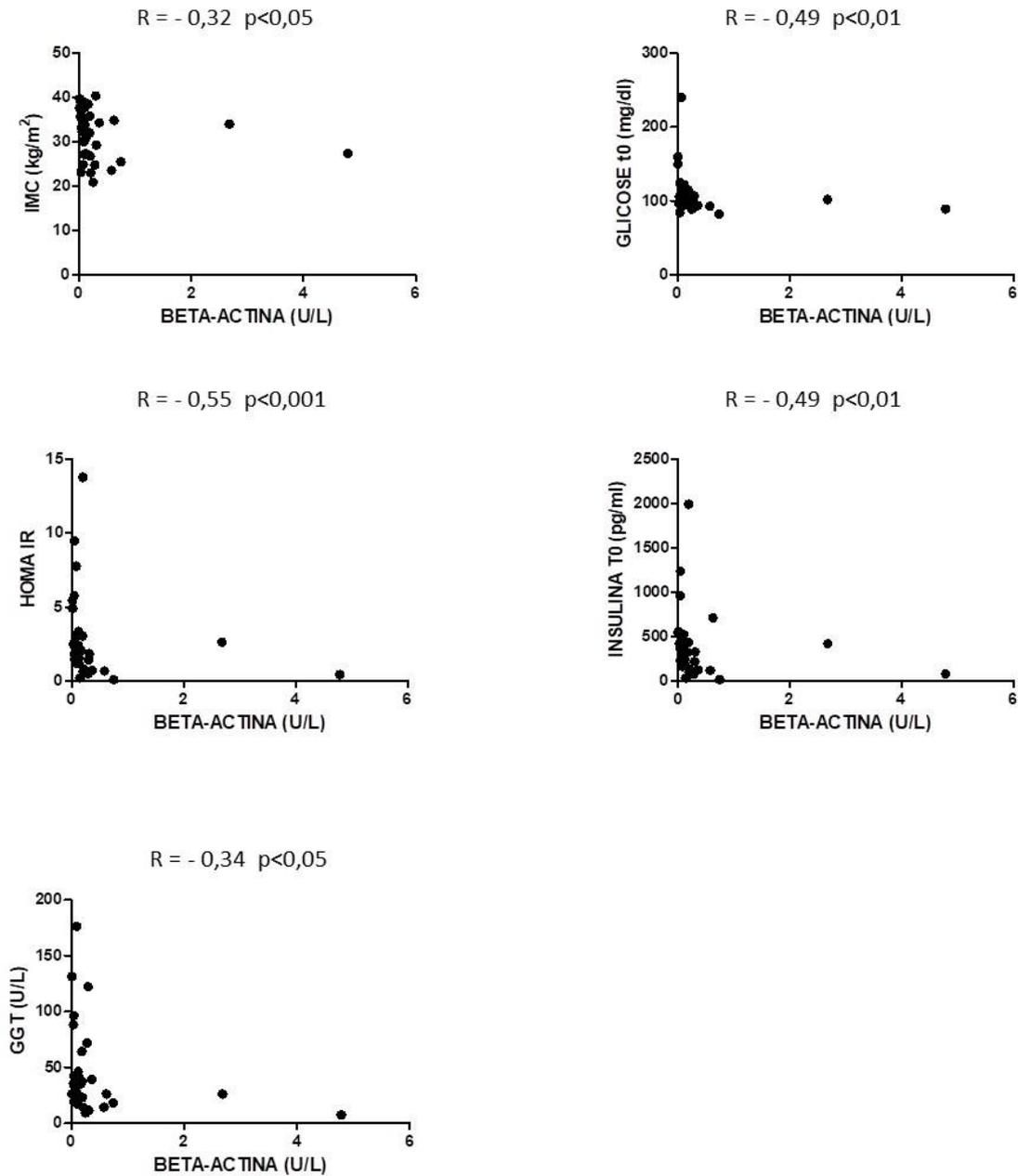
IMC: índice de massa corporal; HbA1c: hemoglobina glicada; TGP: alanina aminotransferase; GGT: gamaglutamil transferase; ET: espessura total; AV: altura do vilo; GLIC 0: glicose no tempo 0; INS 0: insulina no tempo 0.

Fonte: A Autora, 2018.

A fosfomiosina apresentou correlação direta com a  $\beta$ -actina e inversa com a vilina. A  $\beta$ -actina (figura 18) demonstrou correlação inversa com o IMC, glicose no tempo 0, HOMA IR, insulina no tempo 0 e GGT. Houve associação ainda da  $\beta$ -actina e ferritina ( $\rho = -0,33$ ;  $p < 0,05$ ).

De forma inesperada, a vilina se correlacionou inversamente com a espessura total do epitélio e a altura do vilo ( $\rho = -0,34$ ;  $p < 0,05$ , para ambas).

Figura 18 - Correlação linear da  $\beta$ -actina e parâmetros antropométricos e bioquímicos



Fonte: A Autora, 2018.

Avaliamos também a atividade da fosfatase alcalina intestinal e sua correlação com outros parâmetros, tendo em vista sua importância na detoxificação do LPS. Não encontramos relação com nenhum dado antropométrico, proteínas do epitélio ou índices na elastografia hepática. Entretanto, observamos correlações desta variável com algumas medidas bioquímicas (tabela 23).

Tabela 23 - Correlações da fosfatase alcalina intestinal com variáveis bioquímicas em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose

	HbA1c (%)	GLIC0 (mg/dl)	GLI <sub>AUC</sub>	GGT (U/ml)
FAI (U/ml)	<b>-0,62**</b>	<b>-0,50**</b>	<b>-0,48**</b>	<b>-0,39*</b>

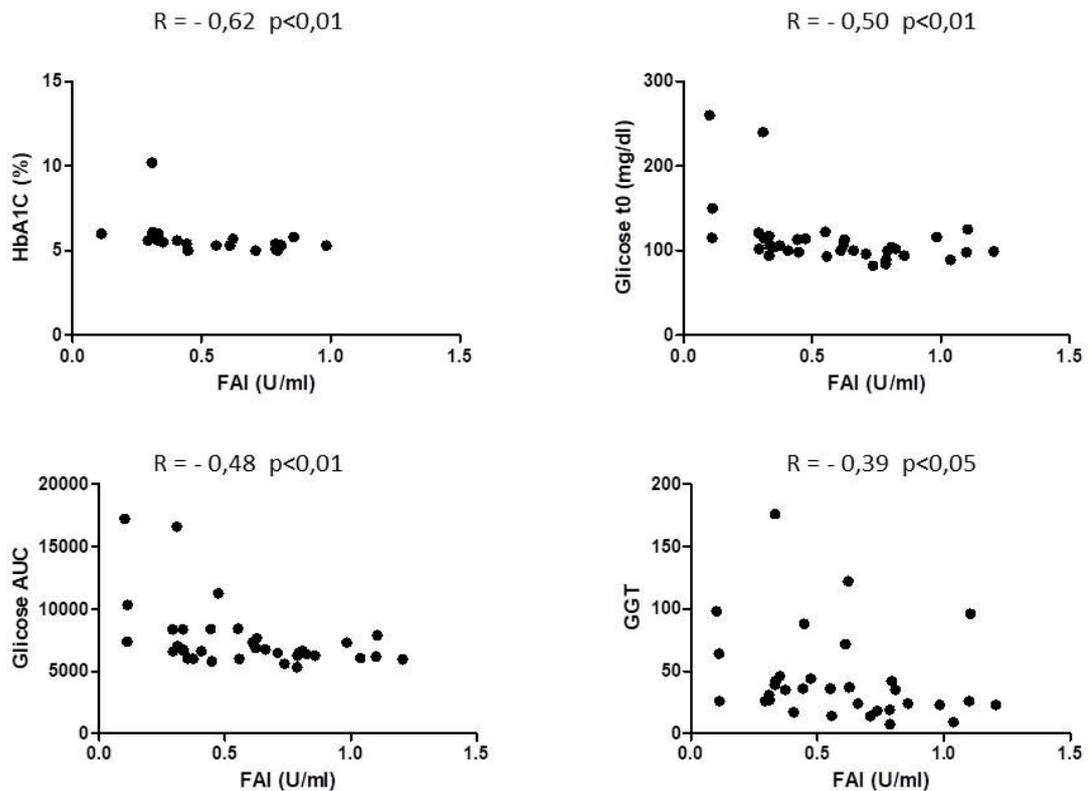
Legenda: \*P<0,05. \*\*P<0,01 \*\*\*P<0,001

HbA1c: hemoglobina glicada; GLIC 0: glicose tempo 0; GLI<sub>AUC</sub>: glicose sob a curva; GGT: gamaglutamil transferase.

Fonte: A Autora, 2018.

Observamos uma relação inversa entre a fosfatase alcalina intestinal e a hemoglobina glicada, a glicose e a GGT (figura 19).

Figura 19 - Correlação linear da FAI e parâmetros glicêmicos e hepáticos



Fonte: A Autora, 2018.

Em relação às análises histomorfométricas, as correlações estão apresentadas na tabela 24, a seguir.

Tabela 24 - Correlações entre histomorfometria do epitélio intestinal e variáveis clínicas e laboratoriais em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose

	<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>GGT (U/ml)</b>	<b>ET(μm)</b>	<b>GLIC<sub>AUC</sub></b>	<b>LPS 60 (U/ml)</b>
<b>ET (μm)</b>	-0,07	0,01	-	0,20	<b>-0,39*</b>
<b>AV (μm)</b>	-0,18	0,02	<b>0,95***</b>	0,19	<b>-0,32*</b>
<b>DV I (μm)</b>	0,03	0,19	0,19	<b>0,33*</b>	-0,01
<b>AC (μm)</b>	0,27	<b>0,39*</b>	<b>0,46**</b>	0,21	<b>-0,37*</b>
<b>REL V/C</b>	<b>-0,44**</b>	-0,40	0,20	-0,02	0,10

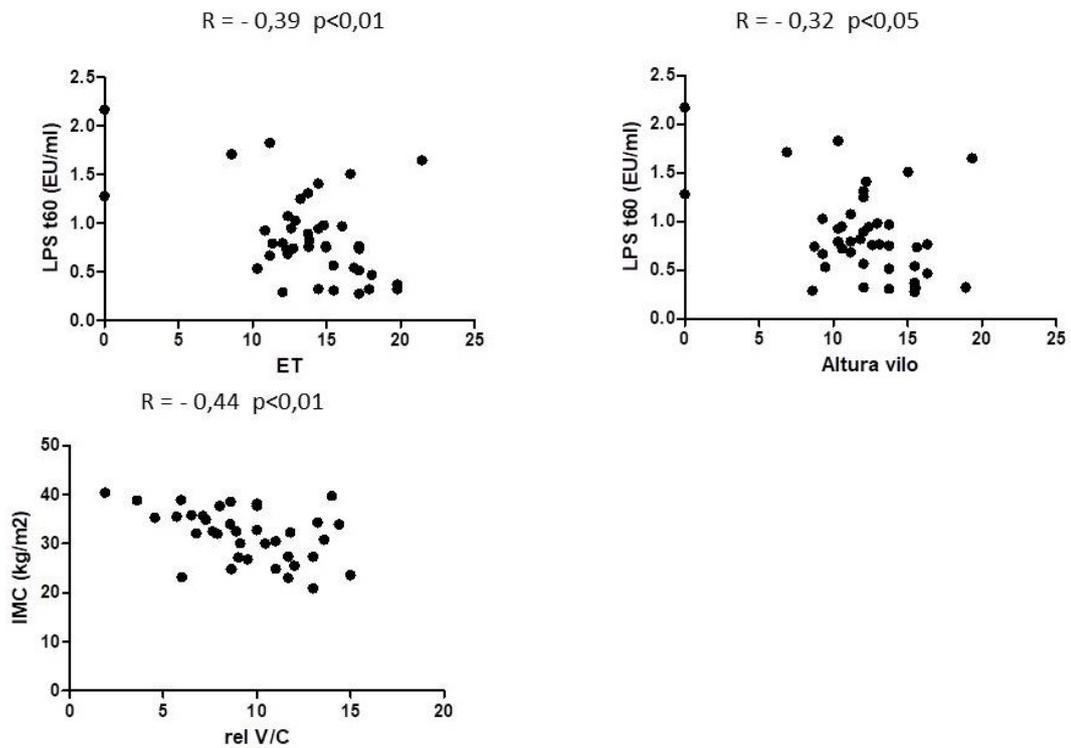
Legenda: \*P<0,05. \*\*P<0,01 \*\*\*P<0,001

ET = espessura total; AV = altura do vilão; DV I = diâmetro do vilão I; DV II = diâmetro do vilão II; AC = altura da cripta; V/C = relação vilosidade/cripta; IMC: índice de massa corporal; GGT: gama-glutamil transferase; FA: fosfatase alcalina; GLIC<sub>AUC</sub>: glicose sob a curva; LPS 60: Lipopolissacarídeo no tempo 60 min; IL-6: interleucina 6.

Fonte: A Autora, 2018.

A espessura total do epitélio e a altura do vilão se correlacionaram inversamente com o LPS no tempo 60. O IMC também se correlacionou negativamente à relação vilosidade/cripta (Figura 20). O diâmetro do vilão I demonstrou uma relação direta com a glicose sob a curva, mas não com o LPS. Analogamente, a altura da cripta se correlacionou diretamente com a GGT e inversamente com o LPS. O parâmetro diâmetro do vilão II não teve relação com nenhum parâmetro, sendo excluído da tabela 24.

Figura 20 - Análises histomorfométricas



Fonte: A Autora, 2018.

### 9.2.3 Correlações da elastografia hepática

Correlacionamos os índices de kPa (grau de fibrose) e o CAP (grau de esteatose) com os marcadores antropométricos, bioquímicos, inflamatórios e do epitélio intestinal. Observamos que o kPa teve relação direta com o IMC, a TGP, a glicose, a insulina, HOMA IR e TNF. Seguindo o mesmo padrão, o CAP se relacionou diretamente com a CA, RCQ, IMC, peso, TGO, TGP, glicose, insulina, ferritina, TNF, leptina (vide tabelas 25 e 26, figura 21).

Tabela 25 - Correlação entre as variáveis antropométricas e bioquímicas com a elastografia em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose

	CA (cm)	RCQ	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	PESO (kg)	TGO (U/ml)	TGP (U/ml)	GLIC60 (mg/dl)	INS 0 (pg/ml)	HOMA IR
<b>kPa</b>	0,26	0,17	<b>0,40*</b>	0,16	0,35	<b>0,74***</b>	<b>0,35*</b>	<b>0,44**</b>	<b>0,44**</b>
<b>CAP (dB/m)</b>	<b>0,54**</b>	<b>0,50*</b>	<b>0,51**</b>	<b>0,58***</b>	<b>0,63**</b>	<b>0,63**</b>	<b>0,37*</b>	<b>0,37*</b>	0,36

Legenda: \*P<0,05. \*\*P<0,01 \*\*\*P<0,001

CA: circunferência abdominal; RCQ: relação cintura-quadril; IMC: índice de massa corporal; TGO: aspartato aminotransferase; TGP: alanina aminotransferase; GLIC 60: glicose tempo 60'; INS 0: insulina tempo 0.

Fonte: A Autora, 2018.

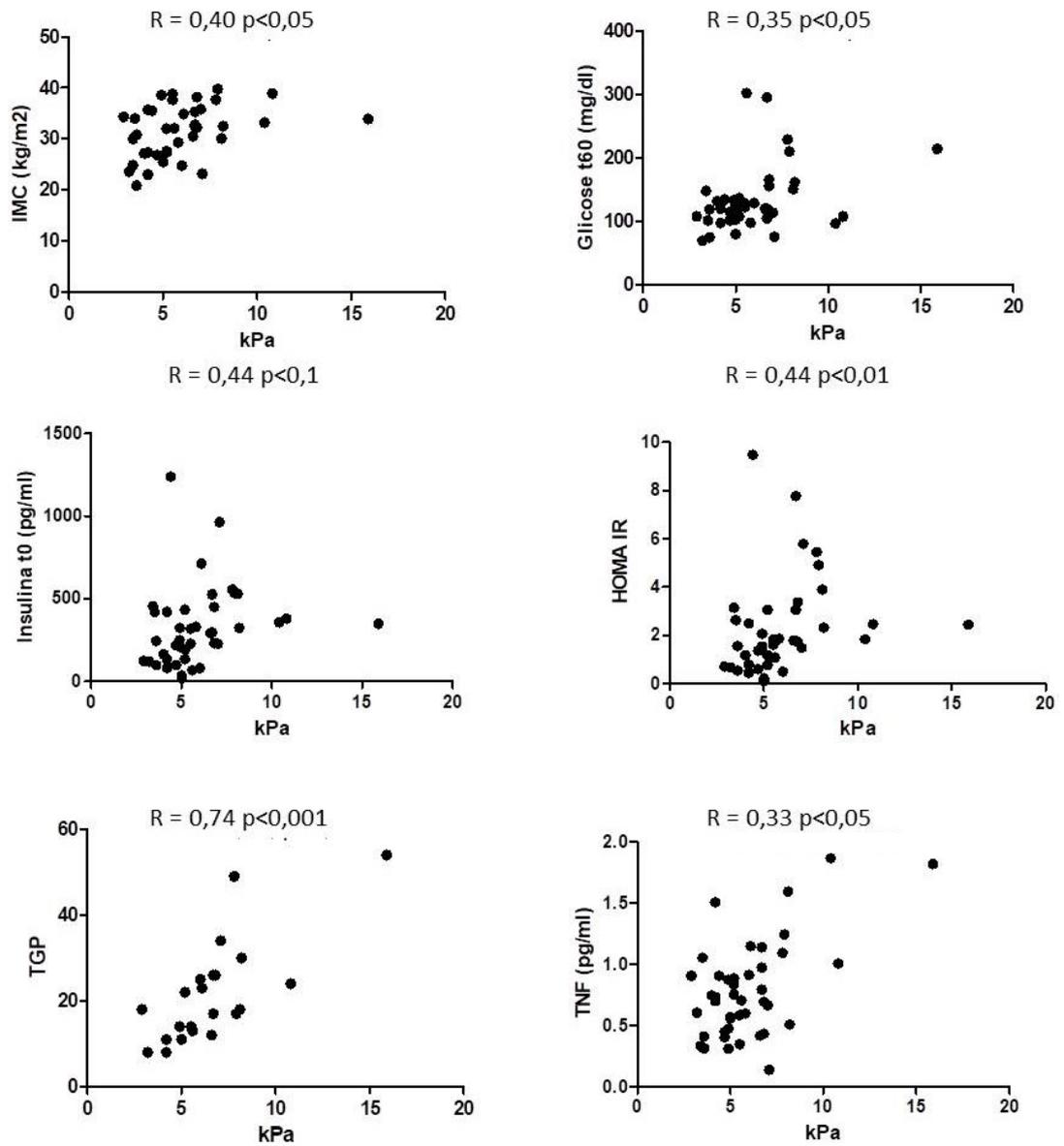
Tabela 26 - Correlação entre as variáveis bioquímicas com a elastografia em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose

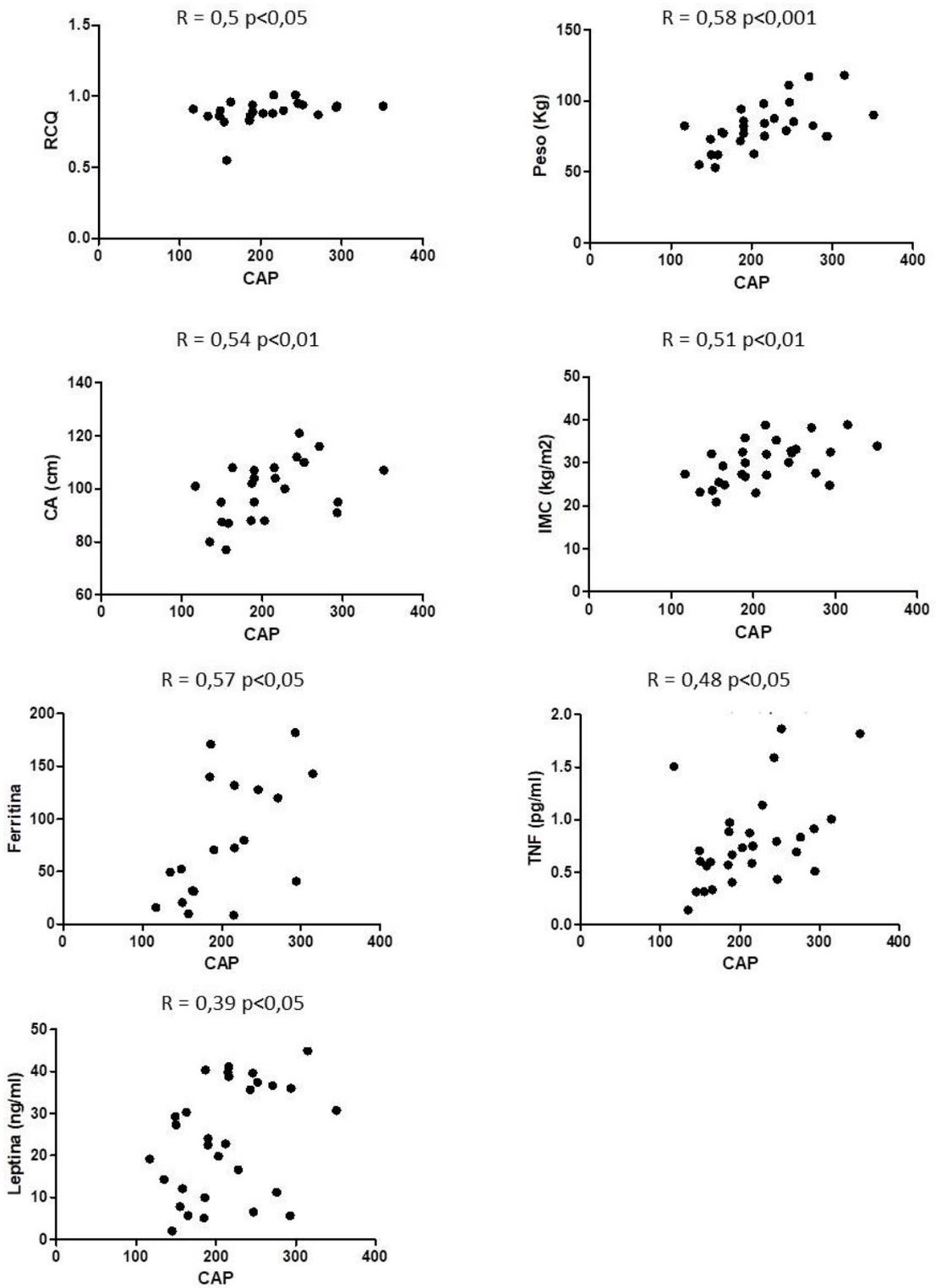
	Ferritina (ng/ml)	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	Leptina (ng/ml)
<b>kPa</b>	0,20	<b>0,33*</b>	0,02
<b>CAP (dB/m)</b>	<b>0,57*</b>	<b>0,48**</b>	<b>0,39*</b>

Legenda: \*P<0,05. \*\*P<0,01 \*\*\*P<0,001.

Fonte:A Autora, 2018.

Figura 21 - Correlações da elastografia hepática e variáveis antropométricas e bioquímicas





Fonte: A Autora, 2018.

Em relação às proteínas estruturais do epitélio, somente encontramos associações da  $\beta$ -actina e da vilina com os índices da elastografia. A  $\beta$ -actina se correlacionou inversamente com o kPa. No que concerne a vilina, foi demonstrada uma relação direta entre a expressão da mesma e o índice de kPa (tabela 27, figura 22).

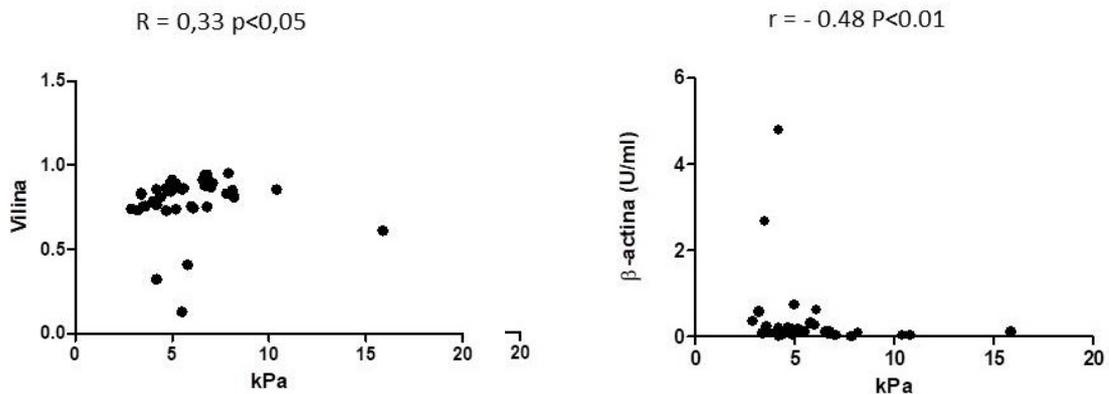
Tabela 27 - Correlação entre as variáveis epiteliais com a elastografia em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose

	$\beta$ -actina (U/ml)	Vilina (U/ml)
kPa	-0,48**	0,33*
CAP (dB/m)	-0,39	-0,07

Legenda: \*P<0,05. \*\*P<0,01 \*\*\*P<0,001.

Fonte:A Autora, 2018.

Figura 22 - Correlações da elastografia e proteínas estruturais



Fonte:A Autora, 2018.

#### 9.2.4 Correlações da microbiota intestinal

Como já dito anteriormente, a microbiota intestinal apresentou grande variabilidade individual. Analisamos a correlação de todas as variáveis com as Otus, sendo os resultados mais relevantes inseridos nas tabelas a seguir. Entre os marcadores antropométricos, encontramos correlações com todos os filos estudados (exceto *Verrucomicrobia*), representados por Otus específicas, conforme visualizado na tabela 28.

Tabela 28 - Correlação entre a microbiota intestinal e índices antropométricos em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose

	Otu26 (B)	Otu55 (B)	Otu41 (T)	Otu43 (P)	Otu113 (P)	Otu145 (P)	Otu126 (F)	Otu129 (F)
Idade (anos)	<b>0,33*</b>	0,05	0,09	0,004	<b>0,34*</b>	0,16	<b>-0,36*</b>	0,05
RCQ	0,01	0,04	-0,11	-0,06	0,08	-0,24	0,09	0,15
Peso (Kg)	-0,15	<b>-0,44**</b>	<b>-0,48**</b>	<b>-0,36*</b>	-0,08	<b>-0,50**</b>	-0,04	0,22
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0,13	<b>-0,47**</b>	<b>-0,46**</b>	<b>-0,34*</b>	0,07	<b>-0,37*</b>	-0,15	<b>0,35*</b>
MG (kg)	-0,17	<b>-0,44**</b>	-0,47	<b>-0,40*</b>	-0,05	<b>-0,49**</b>	-0,20	<b>0,36*</b>
MG (%)	-0,15	-0,40*	-0,44	<b>-0,36*</b>	0,05	<b>-0,42*</b>	-0,32	<b>0,42*</b>

Legenda: \*P<0,05. \*\*P<0,01

Otu: unidade taxonômica operacional; B: Filo *Bacteroidetes* ; T: filo *Tenericutes*; P: filo *Proteobacteria*; F: filo *Firmicutes*; MG: massa gorda

Fonte:A Autora, 2018.

Houve uma associação direta da idade com os filos *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* (Otus 26 e 113, respectivamente) e inversa com o filo *Firmicutes* (Otu 126). Os filos *Bacteroidetes*, *Tenericutes* e *Proteobacteria* apresentaram correlação inversa com o peso e o IMC, e direta com a massa magra. Observou-se ainda uma correlação linear direta entre o IMC ( $\rho = 0.35$ ,  $P < 0,05$ ) e a massa gorda ( $\rho = 0.36$ ,  $P < 0,05$ ) com o filo *Firmicutes*.

A tabela 29 resume os achados entre a microbiota e o metabolismo da glicose. Como podemos observar, o filo *Bacteroidetes* apresentou resultados conflitantes, diferente do filo *Firmicutes*, que manteve um padrão, demonstrando ter uma correlação inversa com a hemoglobina glicada, glicose e insulina.

Tabela 29 - Correlação entre a microbiota intestinal e metabolismo da glicose em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose

	Otu35 (B)	Otu55 (B)	Otu70 (F)	Otu78 (F)	Otu92 (F)	Otu126 (F)	Otu141 (F)	Otu160 (F)	Otu170 (F)	Otu185 (F)	Otu213 (F)
HbA1c (%)	<b>0,24</b>	<b>-0,47*</b>	-0,16	-0,25	<b>-0,54*</b>	-0,34	-0,26	0,06	<b>-0,47*</b>	<b>-0,59**</b>	-0,21
GLIC <sub>AUC</sub>	<b>0,44**</b>	0,03	<b>-0,36*</b>	<b>-0,45**</b>	-0,10	<b>-0,44**</b>	<b>-0,33*</b>	<b>-0,33*</b>	<b>-0,45**</b>	<b>-0,49**</b>	<b>-0,37*</b>
INS <sub>AUC</sub>	0,14	0,12	-0,30	-0,12	-0,15	-0,32	-0,06	<b>-0,37*</b>	-0,12	-0,30	-0,09

Legenda: \*P<0,05. \*\*P<0,01

Otu: unidade taxonômica operacional; B: Filo *Bacteroidetes* ; F: filo *Firmicutes*; HbA1c: hemoglobina glicada; Glic<sub>AUC</sub>: glicose na área sob a curva; insulina<sub>AUC</sub>: insulina na área sob a curva

Fonte: A Autora, 2018.

Em relação às provas de função hepática, nota-se que o filo *Bacteroidetes* apresentou correlação direta com a GGT e a fosfatase alcalina. Já os filios *Firmicutes* e *Proteobacteria* demonstraram correlação inversa com tais enzimas hepáticas, conforme discriminado na tabela 30.

Tabela 30 - Correlação entre a microbiota intestinal e as provas de função hepáticas em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose

	Otu 35 (B)	Otu 92 (F)	Otu 126 (F)	Otu 213 (F)	Otu 116 (P)
TGO (U/ml)	0,09	<b>-0,37*</b>	0,03	-0,21	-0,12
TGP(U/ml)	0,25	<b>-0,43*</b>	<b>-0,45*</b>	-0,34	-0,18
GGT(U/ml)	<b>0,48**</b>	-0,16	-0,31	<b>-0,36*</b>	<b>-0,36*</b>
FA(U/ml)	<b>0,46*</b>	-0,19	-0,16	-0,04	-0,17

Legenda: \*P<0,05. \*\*P<0,01; Otu: unidade taxonômica operacional; B: Filo *Bacteroidetes*; P: filo *Proteobacteria*; F: filo *Firmicutes*

Fonte: A Autora, 2018.

Avaliamos também a associação da microbiota intestinal com os níveis de LPS e LBP, segundo a tabela 31.

Tabela 31- Correlação entre a microbiota intestinal e o LPS/LBP em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose

	Otu02 (B)	Otu55 (B)	Otu103 (B)	Otu70 (F)	Otu83 (F)	Otu141 (F)	Otu113 (P)
LPS 0 (EU/ml)	0,12	-0,04	-0,15	0,13	0,26	0,20	<b>-0,37*</b>
LPS 30 (EU/ml)	<b>0,34*</b>	-0,31	-0,17	0,10	0,28	-0,01	<b>-0,39*</b>
LPS 60 (EU/ml)	0,08	-0,19	<b>-0,35*</b>	0,24	0,26	<b>0,39*</b>	<b>-0,39*</b>
LPS <sub>AUC</sub>	0,21	-0,20	-0,26	0,12	<b>0,37*</b>	0,16	<b>-0,39*</b>
LBP (µg/ml)	0,20	<b>-0,40*</b>	0,16	<b>0,41*</b>	-0,001	0,07	-0,16

Legenda: \*P<0,05. Otu: unidade taxonômica operacional; B: Filo *Bacteroidetes*; P: filo *Proteobacteria*; F: filo *Firmicutes*

Fonte: A Autora, 2018.

Em relação ao LPS e ao filo *Bacteroidetes*, encontramos resultados conflitantes nas Otus 02, 55 e 103, conforme descrito na tabela acima. Na verdade, tais Otus pertencem a um mesmo gênero (*Bacteroides*) na cadeia taxonômica, porém não foi possível classificar a

espécie por meio das nossas análises. O filo *Firmicutes* (Otu 70, 83 e 141) apresentou resultados mais consistentes, demonstrando uma relação direta entre a presença deste e os níveis de LPS/LBP. Já no que concerne ao filo *Proteobacteria*, observamos uma correlação inversa deste com todos os parâmetros do LPS.

Estudamos ainda a associação da microbiota intestinal com os marcadores inflamatórios, conforme descrito na tabela 32.

Tabela 32 - Correlação entre a microbiota intestinal e marcadores inflamatórios em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose

	Otu35 (B)	Otu41 (T)	Otu57 (F)	Otu129 (F)	Otu153 (F)	Otu155 (F)	Otu160 (F)	Otu133 (V)
<b>IL-6 (pg/ml)</b>	<b>0,39*</b>	<b>-0,40*</b>	<b>0,34*</b>	<b>0,44**</b>	0,09	<b>-0,37*</b>	-0,03	<b>-0,40*</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>	<b>0,37*</b>	-0,08	0,08	0,18	0,24	-0,21	-0,11	0,02
<b>Ferritina (<math>\mu</math>g/ml)</b>	-0,01	0,05	<b>-0,43*</b>	-0,18	<b>0,42*</b>	0,10	<b>-0,56**</b>	0,08

Legenda: \* $P < 0,05$ . \*\* $P < 0,01$ . Otu: unidade taxonômica operacional; B: Filo *Bacteroidetes*; T: filo *Tenericutes*; F: filo *Firmicutes*; V: filo *Verrucomicrobia*

Fonte: A Autora, 2018.

Observamos que o filo *Bacteroidetes* apresentou uma correlação direta com os níveis de IL-6 e TNF ( $\rho = 0.39$ ,  $P < 0.05$ ;  $\rho = 0.37$ ,  $P < 0.05$ ; respectivamente). Em contrapartida, os filios *Tenericutes* e *Verrucomicrobia* demonstraram correlação inversa com a IL-6. Já o filo *Firmicutes* permaneceu com dados controversos, na dependência da Otu analisada, não podendo ser definido se existe relação inflamatória ou não associada.

Nas análises da microbiota e os níveis hormonais, obtivemos resultados estatisticamente significativos com a leptina, adiponectina e grelina (Tabela 33). O GLP-1 não apresentou relevância. O filo *Bacteroidetes*, representado pela Otu 02, demonstrou correlação direta com a leptina ( $\rho = 0.38$ ,  $P < 0.05$ ). O filo *Firmicutes*, no entanto, teve resultados discrepantes em relação a este hormônio. Os filios *Tenericutes*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* foram inversamente relacionados aos níveis de leptina. A adiponectina somente apresentou resultado com a Otu 155. Os resultados da grelina estão sintetizados na tabela 33 a seguir.

Tabela 33 - Correlação entre a microbiota intestinal e marcadores hormonais em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose

	Otu02 (B)	Otu106 (F)	Otu129 (F)	Otu155 (F)	Otu41 (T)	Otu116 (P)	Otu145 (P)	Otu133 (V)
Leptina (ng/ml)	0,38*	-0,38*	0,50**	-0,33*	-0,47**	-0,41*	-0,45**	-0,41*
Adiponectina (ng/ml)	0,25	-0,14	-0,03	-0,33*	-0,16	-0,16	-0,28	-0,24

	Otu78 (F)	Otu153 (F)	Otu86 (B)	Otu130 (T)
GHR <sub>AUC</sub>	0,40*	-0,41*	0,33*	-0,37*

Legenda: \*P<0,05. \*\*P<0,01. Otu: unidade taxonômica operacional; B: Filo *Bacteroidetes* ; T: filo *Tenericutes*; F: filo *Firmicutes*; V: filo *Verrucomicrobia*; GHR<sub>AUC</sub>: grelina na área sob a curva.

Fonte: A Autora, 2018.

Comparamos também a microbiota intestinal com as variáveis do epitélio intestinal, conforme a tabela 34. A fosfomiosina, a espessura total do epitélio, a altura do vilão e a altura da cripta não apresentaram nenhuma correlação com significância estatística. A relação fosfomiosina/miosina teve correlação direta tanto com o filo *Bacteroidetes* quanto o *Firmicutes*. A  $\beta$ -actina demonstrou associação direta com o filo *Firmicutes* e *Verrucomicrobia*. A vilina, por sua vez, apresentou correlação inversa com o filo *Bacteroidetes* e direta com o filo *Firmicutes*. A relação vilosidade/cripta apresentou correlação direta com o filo *Firmicutes* ( $\rho = 0.45$ ,  $P < 0.01$ ). Por fim, a fosfatase alcalina intestinal teve somente relação com a Otu 185, representante do filo *Firmicutes*, com associação positiva.

Tabela 34 - Correlação entre a microbiota intestinal e epitélio intestinal em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose

	Otu35 (B)	Otu55 (B)	Otu198 (B)	Otu103 (B)	Otu83 (F)	Otu92 (F)	Otu106 (F)	Otu129 (F)	Otu157 (F)	Otu185 (F)	Otu130 (T)	Otu133 (V)
<b>P-miosina</b>	0,12	-0,09	-0,12	-0,07	-0,02	0,15	0,25	-0,37	-0,23	0,14	0,24	-0,02
<b>P- M/M</b>	0,31	<b>0,46*</b>	-0,19	-0,12	-0,04	<b>0,57**</b>	<b>0,46*</b>	0,07	0,07	0,13	0,07	0,14
<b>β-actina</b>	0,24	0,14	0,27	0,01	-0,15	<b>0,48**</b>	0,32	-0,10	-0,30	0,09	0,05	<b>0,37*</b>
<b>Vilina</b>	<b>-0,37*</b>	-0,10	<b>-0,37*</b>	0,17	<b>0,54**</b>	-0,19	-0,09	-0,08	<b>0,47**</b>	-0,05	-0,07	0,13
<b>ET(μm)</b>	0,20	0,27	0,16	-0,14	-0,20	0,28	-0,12	-0,11	-0,21	-0,05	-0,17	-0,01
<b>AV(μm)</b>	0,11	0,34	0,14	-0,13	-0,16	0,32	-0,15	-0,18	-0,19	-0,06	-0,17	0,01
<b>DV I (μm)</b>	-0,03	0,06	-0,07	<b>-0,51**</b>	-0,12	-0,05	<b>-0,44*</b>	0,02	-0,13	-0,20	<b>-0,41*</b>	-0,18
<b>DV II (μm)</b>	0,15	-0,19	0,06	-0,16	0,01	-0,16	-0,26	<b>0,41*</b>	0,00	0,01	-0,10	-0,07
<b>AC (μm)</b>	0,24	0,08	-0,08	-0,21	-0,13	-0,14	-0,08	-0,01	-0,22	-0,08	-0,33	0,01
<b>REL V/C</b>	-0,16	0,25	0,17	0,05	0,04	<b>0,45**</b>	0,07	-0,14	0,05	0,01	0,20	0,03
<b>FAI (U/ml)</b>	-0,12	-0,09	-0,13	0,17	0,12	0,14	0,13	-0,13	-0,23	<b>0,38*</b>	0,20	0,16

Legenda: \*P<0,05. \*\*P<0,01. P-miosina: fosfomiosina; P-M/M: fosfomiosina/miosina; ET = espessura total; AV = altura do vilão; DV I = diâmetro do vilão I; DV II = diâmetro do vilão II; AC = altura da cripta; V/C = relação vilosidade/cripta; FAI=fosfatase alcalina intestinal; Otu: unidade taxonômica operacional; B: Filo *Bacteroidetes* ; T: filo *Tenericutes*; F: filo *Firmicutes*; P: Filo; V: filo *Verrucomicrobia*.

Fonte: A Autora, 2018.

Nos dados de elastografia hepática, houve significância estatística somente nas comparações entre os filões *Firmicutes* e *Proteobacteria*, conforme tabela 35. Tais filões apresentaram correlação linear inversa com o grau de fibrose e esteatose.

Tabela 35 - Correlação entre a microbiota intestinal e elastografia em indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose

	Otu30 (F)	Otu74 (F)	Otu92 (F)	Otu116 (P)	Otu145 (P)
<b>Fibrose (kPa)</b>	<b>0,39*</b>	<b>-0,34*</b>	<b>-0,47**</b>	-0,08	-0,07
<b>CAP (dB/m)</b>	0,08	-0,08	-0,23	<b>-0,56**</b>	<b>-0,40*</b>

Legenda: \*P<0,05. \*\*P<0,01. Otu: unidade taxonômica operacional; F: filo *Firmicutes*; P: Filo *Proteobacteria*.

Fonte: A Autora, 2018.

## 10. DISCUSSÃO

Nosso objetivo primário foi avaliar as possíveis correlações entre alguns marcadores séricos inflamatórios, a morfologia duodenal, dados de elastografia e a microbiota intestinal. Acreditamos que, dadas às diversas correlações demonstradas, tivemos êxito na conclusão deste estudo e demonstramos que existem correlações entre eles, o que suscita questionamentos para pesquisas futuras.

Dentre os marcadores séricos avaliados, detectamos que o LPS apresentou correlação positiva com o peso, a circunferência abdominal, a massa gorda e a ferritina (tabela 21). Esse achado reforça os dados da literatura de que há aumento dos níveis de LPS em pacientes obesos (17, 39, 42, 56, 57, 67).

Comparando os dados da morfologia intestinal duodenal, o LPS apresentou relação inversa à espessura total e altura do vilão (tabela 24). Uma explicação a ser aventada seria o adelgaçamento da parede do epitélio intestinal, provocando maior permeação do LPS bacteriano, havendo então elevação dos seus níveis na corrente sanguínea (42, 46-48, 159). Tendo como base essa hipótese, seria esperado encontrarmos alguma relação entre o LPS e as proteínas estruturais do epitélio, o que não se confirmou na nossa análise.

Além disso, o LPS não demonstrou nenhuma correlação com os índices de elastografia hepática (tabelas 25 e 26), o que contradiz os achados em trabalhos anteriores que demonstraram o papel desta endotoxina na evolução da doença hepática gordurosa (94, 118, 124, 137, 140, 160). Uma das explicações possíveis para tais resultados discrepantes seria a falta de padronização na literatura sobre a detecção do LPS. Os métodos utilizados são extremamente variáveis entre os estudos, causando falhas de aferição. Como já citado anteriormente, os níveis de LPS e LBP séricos têm amplos intervalos que se sobrepõem às variações fisiológicas normais (76, 137), tornando a sua análise um desafio.

Sobre as proteínas estruturais do epitélio intestinal, a que encontramos maior relevância foi a  $\beta$ -actina (tabelas 22 e 27). A  $\beta$ -actina se relacionou inversamente com o IMC, a glicose, a insulina, o índice HOMA-IR, a TGP e o índice de fibrose (kPa, será descrito com mais detalhes a seguir). Esse fato, mais uma vez, ratifica o possível papel da disrupção do epitélio intestinal na patogênese da obesidade, disglícemia e doença hepática. Tal proteína teria um efeito protetor, estando presente em maior quantidade nos indivíduos com menores índices antropométricos, associada a menores taxas de inflamação hepáticas e resistência insulínica. De forma imprevista, a vilina se correlacionou inversamente com a espessura total

do epitélio e a altura do vilão, o que não seria esperado, por se tratar de uma proteína chave do epitélio intestinal. Uma explicação para esse ocorrido pode ter sido o método de detecção (imunohistoquímica), com perda de material durante o processamento das amostras, tornando tais resultados espúrios.

A fosfomiosina se correlacionou negativamente com a vilina e positivamente com a  $\beta$ -actina (tabela 22), sendo tais achados considerados irrelevantes no presente estudo. Observamos uma relação inversa entre a fosfatase alcalina intestinal e a hemoglobina glicada, a glicose e a GGT (tabela 23). Uma hipótese para esse resultado seria que, em indivíduos diabéticos e com NASH, a fosfatase alcalina teria sua atividade reduzida, impactando na depuração do LPS, que se manteria mais ativo, promovendo o estado inflamatório inerente a tais condições. Esse achado já havia sido descrito anteriormente em modelos animais (80).

Dentre as medidas histomorfológicas (tabela 24), o IMC se correlacionou negativamente à relação vilosidade/cripta, salientando mais uma vez a hipótese de que um desarranjo epitelial poderia estar presente em obesos. O diâmetro do vilão I demonstrou uma relação direta com a glicose sob a curva, mas não com o LPS. Tal fato corrobora os resultados de estudos experimentais em camundongos diabéticos, onde se observa o aumento do diâmetro das vilosidades intestinais, o que promoveria uma melhora da capacidade absorptiva dos alimentos (29, 58-61). Analogamente, a altura da cripta se correlacionou diretamente com a GGT e inversamente com o LPS, o que poderia indicar também uma maior capacidade de extrair nutrientes da dieta, com aumento do aporte energético, evoluindo, em última análise, com o aumento da deposição de gordura no fígado, independente nos níveis de LPS.

A hipótese da perda da integridade da barreira intestinal, com maior permeação de antígenos bacterianos do lúmen intestinal para a circulação, foi descrita inicialmente por *Cani et al* em 2007 (17, 42, 56, 57, 67). Posteriormente, aventou-se a hipótese de que a microbiota intestinal, associada à dieta, poderiam ser fatores impactantes na barreira intestinal, através do aumento de LPS circulante (57, 161). Seguindo essa linha, outros autores também evidenciaram um aumento do LPS sérico (47, 162, 163), além de disbiose (27, 164-169), em pacientes diabéticos. Foi demonstrado que a administração de LPS em animais e humanos eleva os marcadores inflamatórios e os índices de resistência à insulina, corroborando com o possível papel do LPS nas doenças metabólicas caracterizadas por inflamação de baixo grau (170, 171). Baseados nessas evidências, dois estudos que utilizaram o marcador  $^{51}\text{Cr-EDTA}$  demonstraram o aumento da permeabilidade intestinal em pacientes com DM2, comparando com indivíduos saudáveis (172, 173). Nestas análises, a associação entre permeabilidade

intestinal, dieta, antropometria e bioquímica não foram confirmadas, apesar de ter havido uma correlação positiva do aumento da permeabilidade com os marcadores séricos inflamatórios.

Recentemente, o mesmo grupo publicou um estudo caso-controle desenhado para investigar o papel da microbiota e permeabilidade intestinal em pacientes diabéticos, pareados por idade, com indivíduos saudáveis (174). De forma contraditória, não foram encontradas diferenças significativas entre os pacientes diabéticos e controles no quesito aumento da permeabilidade ou alteração da microbiota intestinal. Outro dado interessante foi em relação ao LPS, que apresentou maiores níveis em pacientes magros quando comparados aos obesos ambos sem disglucemia, demonstrando mais uma vez a falta de consenso sobre esse assunto.

De certa forma, tais resultados corroboram com os nossos achados na comparação entre os grupos, exceto pelos resultados observados com o LPS, pois também não encontramos diferenças significativas entre a permeabilidade intestinal (representada pelas proteínas estruturais e análises histomorfométricas) e a microbiota entre os grupos analisados.

No que diz respeito aos índices da elastografia hepática (tabelas 25 e 26), observamos que o índice de fibrose teve relação direta com o IMC, a TGP, a glicose, a insulina, HOMA IR e TNF- $\alpha$ , em consonância com os mecanismos fisiopatológicos da doença gordurosa hepática não alcoólica. De forma semelhante, o CAP se relacionou diretamente com a CA, RCQ, IMC, TGO, TGP, glicose, insulina, ferritina, TNF- $\alpha$  e leptina. Tais achados confirmam o que já é conhecido na literatura, demonstrando o papel da obesidade e sobrepeso na evolução da DHGNA (92, 94).

Dentre os marcadores inflamatórios, houve uma relação positiva entre a ferritina, a IL-6 e o TNF- $\alpha$  com as provas de função hepáticas, conforme descrito anteriormente (tabela 21). Isso confirma o fato de que a DHGNA é uma doença inflamatória, o que já é bem estabelecido na literatura (92, 94, 130, 175).

Outro dado interessante nas análises de elastografia hepática é em relação à  $\beta$ -actina, que mais uma vez demonstrou o seu papel protetor, tendo uma relação inversa com o índice de fibrose (tabela 27). A nossa principal hipótese era de que a menor expressão desta proteína representa a perda da integridade do epitélio, com maior permeação de toxinas, em especial o LPS, e produtos da dieta, ocasionando, em última análise, as manifestações patológicas hepáticas. Os dados referentes à vilina não foram valorizados na nossa análise, apesar de ter havido uma relação positiva desta com o índice de fibrose, pois a quantificação da mesma demonstrou uma série de incompatibilidades durante todo o desenrolar da nossa pesquisa.

A avaliação da DHGNA é complexa. O diagnóstico definitivo requer biópsia hepática, o que, em nosso estudo, não era factível já que faltariam indicações claras para a realização de tal procedimento, dado o seu potencial de desconforto e eventos adversos (176-178). A elevação dos níveis séricos de aminotransferases, associado ao aumento da ecogenicidade em exames radiográficos, têm sido utilizada como ferramenta diagnóstica (179), apesar das limitações já conhecidas. A elastografia hepática tem a vantagem de ser um método não invasivo, de fácil realização e que não necessita de jejum ou exames laboratoriais prévios. Por esse motivo optamos por utilizá-lo nessa análise. É importante lembrar que valores de referência dependem de algumas variáveis e, principalmente, da patologia existente.

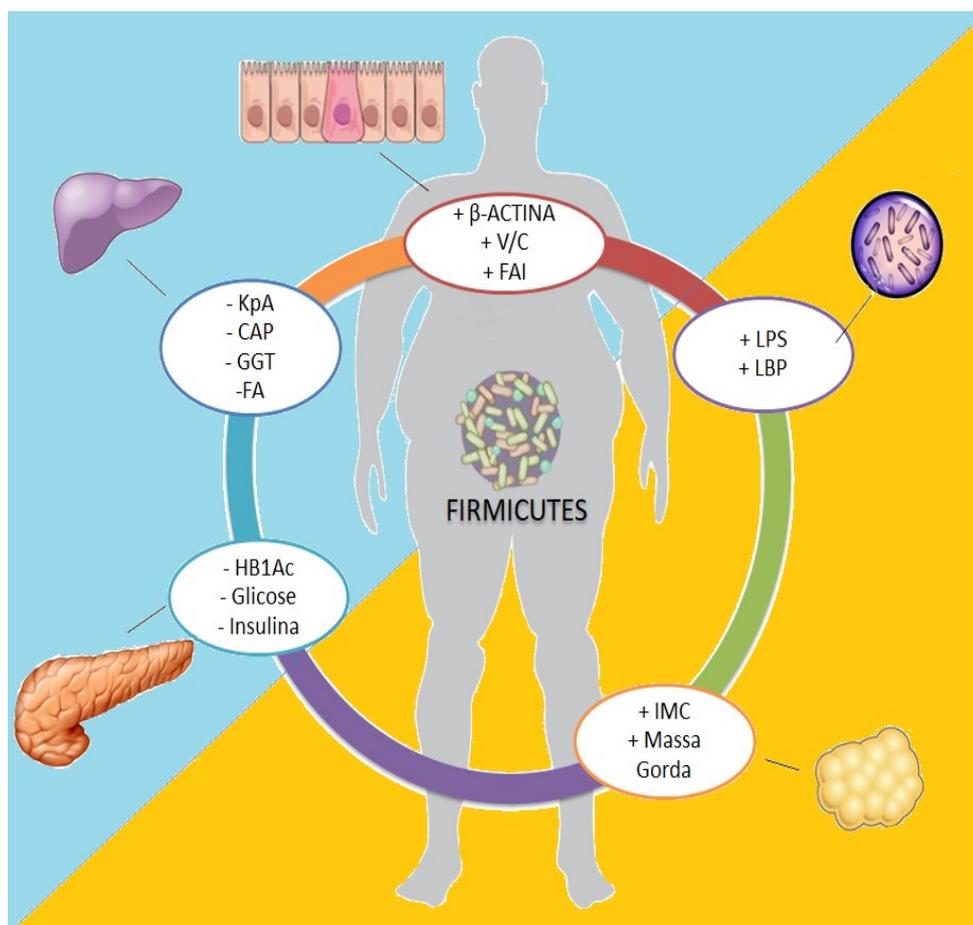
Uma análise multicêntrica recente avaliou 922 pacientes com IMC em torno de  $33,6 \pm 6,5$  kg/m<sup>2</sup> e com diagnóstico de DHGNA confirmada por biópsia hepática. Estes mesmos indivíduos foram submetidos à elastografia hepática. As características de desempenho com duas sondas empregadas no método foram examinadas, uma média (C) e outra extra-grande (XL), através da ferramenta automática de seleção de sonda. Os autores concluíram que houve sucesso da elastografia em estimar o grau de rigidez e nível de esteatose hepáticas, com baixa falha (3,2%) e altas taxas de confiabilidade (> 95%) e reprodutibilidade (175).

Em estudos que avaliaram a elastografia hepática transitória em indivíduos saudáveis, a idade não influenciou significativamente os resultados. Entretanto, já em relação ao gênero e à obesidade, o assunto ainda é controverso (150, 180-182). Algumas referências demonstraram valores de kPa mais elevados em homens, quando comparados às mulheres, porém a relevância clínica deste fato é questionável, já que diferenças de apenas 0,6 kPa entre os gêneros foram observadas. Com relação à obesidade, os estudos de *Sirli e Corpechot et al* não verificaram qual seria a influência significativa do IMC sobre a elastografia (150, 182). Por outro lado, *Roulot et al* encontraram uma tendência de associação entre a elastografia e indivíduos com IMC menor que 25 kg/m<sup>2</sup> e também aqueles com IMC maior que 30 kg/m<sup>2</sup>, sendo os níveis de kPa menores nos primeiros. Já os indivíduos com IMC entre 25 e 30 kg/m<sup>2</sup> apresentaram média de elastografia inferior àqueles com IMC abaixo de 25 kg/m<sup>2</sup>, demonstrando que essa correlação não foi linear. Nas análises posteriores, a presença de síndrome metabólica foi identificada como a única variável independentemente associada a maiores valores de elastografia (180). De modo semelhante, *Colombo et al* observaram associação positiva entre elastografia e esteatose ao exame ultrassonográfico, de forma independente do IMC (183). Em outro estudo, mulheres portadoras de obesidade mórbida em pré-operatório de cirurgia bariátrica foram também submetidas ao FibroScan® apresentando alta prevalência de esteatose grave e fibrose avançada. Os parâmetros de resistência à insulina

foram correlacionados com a esteatose, mas não com a fibrose (184). Por fim, *Huh et al* concluíram em sua análise que a obesidade é a verdadeira causadora da fibrose, independente do perfil metabólico (185). No nosso trabalho, a idade e o gênero não influenciaram os índices da elastografia, já a obesidade foi um fator com forte relação.

As correlações da microbiota intestinal implicaram no maior desafio deste trabalho, devido à grande variabilidade interindividual. Infelizmente, na nossa análise, não houve um padrão entre os filos e os marcadores antropométricos e bioquímicos. Por exemplo, dentro do filo *Bacteroidetes*, apresentamos a Otu 35, que se correlacionou diretamente com marcadores indicativos de inflamação (Glicose AUC, IL-6, TNF- $\alpha$ , GGT e FA) e, de forma contraditória, a Otu 55, que demonstrou correlações negativas com o peso, IMC, hemoglobina glicada e massa magra. O filo *Firmicutes*, de forma semelhante, também apresentou dados controversos, conforme ilustrado na figura 23, a seguir.

Figura 23 - Correlações do filo *Firmicutes*



Legenda: (-) correlação negativa (+) correlação positiva.  
Fonte: A Autora, 2018.

Podemos observar que algumas Otus selecionadas do filo *Firmicutes* demonstraram uma relação direta com o IMC, a massa gorda e os níveis de LPS e LBP, corroborando com a tese do LPS induzindo inflamação e perpetuando o fenótipo obeso. Ao mesmo tempo, outras Otus se relacionaram negativamente com os índices de resistência à insulina e marcadores inflamatórios hepáticos e positivamente com os níveis de  $\beta$ -actina, relação vilosidade-cripta e a fosfatase alcalina intestinal, tendendo a um fenótipo mais saudável. Como aventado anteriormente, estes últimos dados estariam relacionados com a manutenção da integridade do epitélio intestinal, menor permeação de toxinas e, finalmente, menor risco de adiposidade corporal.

Nosso objetivo secundário se baseou em comparar as variáveis do estudo nos grupos de indivíduos com diferentes graus de tolerância à glicose e adiposidade corporal. De forma geral, o grupo OBD apresentou os maiores índices antropométricos e bioquímicos, quando comparado com o grupo OB e C. Os marcadores inflamatórios também apresentaram títulos mais elevados nos indivíduos do grupo OBD (tabelas 9, 11, 12, 13, 14), assim como o kPa e o CAP (tabela 20).

O LPS (tabelas 9,11-14), as proteínas estruturais (tabela 16) e a análise histomorfométrica (tabela 18) não revelaram diferença estatística entre os grupos analisados, diferente da fosfatase alcalina intestinal (tabela 17), que apresentou menor atividade no grupo OBD em relação ao controle. A fosfatase alcalina intestinal é uma enzima presente nos enterócitos e tem o papel de detoxificar as moléculas de LPS. Além disso, já foi demonstrado na literatura a sua influência na regulação positiva da microbiota intestinal, promovendo maior diversidade e quantidade de microorganismos, a sua relação inversa à permeabilidade intestinal e os seus efeitos preventivos sobre a síndrome metabólica (80, 81, 88-91, 186, 187).

A caracterização desta última função foi bem estabelecida em pesquisa com camundongos deficientes para FAI que receberam dieta hiperlipídica, suplementada com FAI, em comparação com os controles, que receberam apenas a dieta. Tal suplementação reverteu as características da síndrome metabólica, demonstrando o importante papel desta enzima (91). Partindo deste pressuposto, o nosso achado de menor atividade da FAI no grupo OBD esteve em concordância com outros autores, podendo estar relacionado à uma maior atividade inflamatória neste grupo de indivíduos, contribuindo para a perpetuação da doença. Esperávamos também encontrar diferenças nos níveis de LPS, porém esse fato não se confirmou na nossa análise entre os grupos, apesar de ter havido uma correlação positiva deste com o peso, circunferência abdominal e massa gorda, como citado anteriormente.

Dentre as proteínas estruturais, a mais relevante na análise foi, sem dúvida, a  $\beta$ -actina. A  $\beta$ -actina é uma proteína estrutural do epitélio. Nos nossos resultados, apesar de não ter havido diferença significativa entre os grupos, talvez em parte pelo tamanho amostral, foi possível notar que havia uma tendência biológica de menor expressão desta proteína no grupo OBD e OB.

Na análise da microbiota intestinal, destacamos a grande variabilidade inter-individual entre os participantes de todos os grupos de estudos (figuras 13 e 14), assim como a ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo no que se refere aos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (figura 15). Quando realizamos uma análise mais detalhada, no entanto, observamos diferença significativa entre os grupos em relação a oito das 47 Otus avaliadas (tabela 20).

Os primeiros estudos que abordaram o tema microbiota intestinal e obesidade utilizaram modelos animais (30). Esses achados foram o gatilho para os mais variados experimentos, que, até hoje, permanecem inconclusivos. Alguns estudos apontam na direção de haver relação entre adiposidade corporal e microbiota intestinal, principalmente na relação entre *Bacteroidetes* e *Firmicutes*(188-193), enquanto outros não conseguiram comprovar tais achados (31, 194-198). Grande parte da variação encontrada pode se dever aos múltiplos fatores que influenciam a composição da microbiota, dentre eles dietéticos, ambientais, imunológicos, modificações do fluxo biliar, alterações no pH gástrico, dismotilidade intestinal, entre outros (127). Tais fatores dificultam a padronização de métodos acurados para estudo da população bacteriana.

Dentre os fatores que tornam o estudo da microbiota intestinal ainda mais complexo, destacamos a influência da dieta (199-204). Já foi demonstrado, por exemplo, que dietas ricas em gordura alteram a sua composição (205). Além disso, alguns estudos revelaram que o metabolismo bacteriano das substâncias não digeridas fornece uma série de compostos metabólicos microbianos com funções biológicas (204, 206). Enquanto somente poucos estudos sobre a relação da microbiota com produtos microbianos como ácidos graxos de cadeia curta e ácidos biliares secundários com propriedades bioativas foram realizados, muitos outros metabólitos estão sendo estudados ou permanecem desconhecidos (207, 208). O tempo de exposição às dietas específicas e seus efeitos na microbiota intestinal também é um fator que necessita de melhor avaliação. Em estudo recente, jovens saudáveis foram expostos a uma dieta hipercalórica pelo período de sete dias e, na conclusão, não foram encontradas alterações na permeabilidade intestinal, na microbiota intestinal e no metabolismo da glicose (209).

Dada a importância da dieta influenciando a composição da microbiota intestinal, utilizamos no nosso estudo o Questionário de Frequência Alimentar (QFA), com o intuito de graduar o consumo individual dietético, já tendo sido validado em nossa população (210). Não identificamos diferenças entre os grupos estudados para a maioria dos nutrientes, apresentando inclusive maior ingesta calórica (não significativa) para o grupo C em relação ao grupo OB, embora não tenhamos avaliado o gasto energético dos participantes, para tentar fazer qualquer inferência a respeito do balanço energético destes indivíduos. Devemos lembrar ainda que questionários de autoavaliação do consumo dietético há muito tempo são considerados como fonte de viés em várias populações (211-213), o que também deve ser considerado em nosso trabalho. Possivelmente, o maior consumo de calorias do grupo C foi compensado por maior gasto energético diário, de modo a manter a estabilidade do peso dos participantes.

Os três grupos de pacientes demonstraram homogeneidade em relação ao consumo de calorias, lipídios e carboidratos (tabela 10), havendo diferença apenas no consumo proteico, maior no grupo OBD quando comparado ao grupo OB ( $P=0.05$ ). Tal fato, associado à ausência de significância estatística nos níveis de LPS, corroboram com a hipótese da dieta modificando a composição da microbiota intestinal (199-201). No nosso entendimento, a padronização da dieta pode ter sido um fator responsável pela ausência de diferenças na microbiota e no LPS no presente estudo, conforme já descrito na literatura (199-201). Além disso, a maioria dos estudos que analisaram o LPS e a microbiota utilizaram dietas ricas em gorduras, pelo menos em um dos grupos, (57, 70, 80, 137, 214-219), como forma de acentuar a diferença dos marcadores pós-prandiais. Nós optamos por oferecer uma refeição padrão líquida antes da coleta sanguínea, o que também pode ter contribuído para os nossos resultados. Deve-se ressaltar ainda que a literatura é escassa em trabalhos avaliando a resposta do LPS sérico após a ingestão de dieta líquida. Encontramos somente um artigo avaliando o emprego da mesma refeição padronizada do nosso estudo, ingerida no pós-operatório de cirurgia abdominal, no qual os autores relataram menor taxa de infecção naqueles que a utilizaram e concluíram que a dieta enteral precoce nestes pacientes foi acompanhada por redução das complicações infecciosas (220). Neste sentido, nosso trabalho parece corroborar o papel aparentemente “protetor” da dieta utilizada sobre o epitélio intestinal, na medida em que o LPS apresentou curva descendente nos três grupos estudados, apesar de estatisticamente significativa apenas no grupo obeso e disglucêmico (tabela 15).

Durante o desenvolvimento da nossa pesquisa, vários relatos foram descritos associando o uso da metformina e o seu papel na microbiota intestinal (221-227). *Allin et al*

(228) demonstraram que a metformina foi capaz de elevar os níveis da proteína BPI (*bactericidal/permeability-increasing protein*). Esta proteína compete com a LBP pela ligação ao LPS, porém o complexo BPI-LPS não ativa o sistema imune, diferente do complexo LBP-LPS, que atua modulando a cascata inflamatória via receptor TLR-4. Em outras palavras, o uso da metformina teria o benefício de melhorar a inflamação nestes pacientes. Posteriormente a isso, *Pedersen et al*(174) não relataram diferenças no uso da metformina no quesito *status* inflamatório, LPS e microbiota intestinal, demonstrando que mais pesquisas necessitam ser realizadas para elucidar a questão. Em nossa análise, observamos que todos os indivíduos disglucêmicos faziam uso da metformina, tornando essa amostra mais homogênea. Talvez isso possa ter acontecido pela dificuldade em recrutar indivíduos disglucêmicos virgens de tratamento, não podendo ser inferido se esse fato contribuiu para a falta de diferenças no LPS e microbiota entre os grupos.

Dentre as limitações do nosso estudo, a primeira delas se refere ao desenho transversal, que não permite estabelecer inferências sobre causa e efeito. Contudo, diante de tantas contradições na literatura, nosso objetivo foi demonstrar associações para análises futuras, de preferência com desenhos prospectivos e longitudinais. Tivemos ainda perdas amostrais relacionadas ao não preenchimento correto do questionário alimentar, à não realização de alguns exames laboratoriais, à danificação de determinadas amostras teciduais coletadas na endoscopia digestiva e ao não comparecimento dos voluntários em todas as etapas do estudo, já que o mesmo incluía algumas visitas ao local de pesquisa, o que o tornou mais complexo. No geral, houve uma predominância do sexo feminino, além de diferenças de idade entre os grupos OBD e OB (tabela 9), que pode sofrer críticas tendo em vista as variações hormonais. Citamos ainda a possibilidade de perda de mensuração de efeitos biológicos mais tardios, devido à limitação do protocolo de exames, já que fixamos o término da investigação em 1h após a ingestão da refeição padrão. Alguns estudos (70, 217, 218, 229, 230) utilizaram protocolos mais longos, com dosagens de diversos metabólitos que também incluíram o LPS, entretanto com períodos de avaliação que duraram até 5h após a ingestão alimentar. Outra possível fonte de viés pode ter sido o emprego da refeição padrão balanceada líquida, que talvez tenha mascarado o efeito biológico da obesidade, da disglucemia e da microbiota intestinal sobre a evolução temporal dos marcadores dosados em nosso estudo. Ainda em relação aos materiais e métodos, apresentamos algumas perdas de material no processamento da imunohistoquímica e nas análises de western-blot, inerentes às próprias limitações dos métodos (231, 232).

Apesar das dificuldades descritas acima, conseguimos extrair algumas informações relevantes neste trabalho. Primeiramente, selecionamos uma população com uma dieta bastante homogênea, avaliada pelo QFA (tabela 10), o que pode ter refletido a ausência de diferenças entre os filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* na microbiota intestinal, assim como dos níveis de LPS, nos indivíduos do estudo. Tal hipótese demonstra o papel da dieta na avaliação da microbiota intestinal, já sedimentada por outros autores (199, 233).

Outro dado interessante foi a queda do LPS após um estímulo alimentar (tabela 15), fato este ainda não descrito na literatura. Este resultado não parece ter sido ocasionado por algum erro metodológico, já que o mesmo foi observado em todos os grupos e não de forma isolada em um grupo específico. Entretanto, não podemos inferir se o uso da dieta balanceada líquida, não empregada como padrão nesse tipo de análise, influenciou os nossos achados. A investigação de estudos semelhantes não nos auxiliou nessa interpretação, já que os dados da literatura são escassos. Talvez pelo emprego de dietas não balanceadas, os poucos estudos que avaliaram essas variáveis relatem a manutenção dos níveis de LPS ou o aumento deste marcador após a refeição. Esse achado ainda necessita de replicação científica antes de ser confirmado.

Outro fator positivo foram os resultados da FAI. Conseguimos demonstrar sua menor atividade no grupo OBD, além de sua correlação negativa com a GGT, reiterando seu possível papel nos pacientes com obesidade e disglucemia, representação fenotípica da síndrome metabólica. Essa associação poderia servir como base para novos estudos clínicos, com o foco do tratamento sobre a FAI, permitindo talvez a prevenção dessa morbidade e suas complicações. A  $\beta$ -actina também resultou em dados interessantes na nossa análise. Apesar de não termos encontrado diferenças entre os grupos, talvez em parte pelo pequeno tamanho amostral, houve uma tendência biológica a uma maior expressão desta no grupo controle (tabela 16). Nas análises de correlações, a  $\beta$ -actina foi inversamente proporcional ao IMC, aos índices glicêmicos e aos índices hepáticos de inflamação, demonstrando seu possível papel protetor. Na verdade, levando-se em consideração que a  $\beta$ -actina representa o epitélio intestinal, por ser componente importante deste, podemos inferir indiretamente que a sua maior expressão no grupo controle estaria representando uma maior integridade da barreira intestinal, em última análise. Recentemente, foi publicado um estudo onde os autores evidenciaram que a permeabilidade intestinal está aumentada em pacientes obesos com esteatose, quando comparados aos obesos sem esteatose (234). Tal dado fortalece o nosso achado que associou negativamente a  $\beta$ -actina aos índices de elastografia hepática, representados pelo KpA, assim como com os níveis de transaminases hepáticas.

Nossos resultados precisam ser confirmados por novas pesquisas nesse tema. Seria interessante que os estudos em microbiota intestinal deixassem o modelo transversal e passassem para grandes estudos prospectivos (235). Neste sentido, Falcony e cols. (236) estimaram que uma amostra de 1700 indivíduos é necessária para estudar a relação entre obesidade e composição da microbiota intestinal, em um estudo de coorte, após correção para idade, gênero e outras variáveis. Novas perspectivas precisam ser abordadas na condução desse assunto, que permanece ainda controverso.

## CONCLUSÃO

Raros estudos avaliaram a mucosa intestinal em humanos, associado a marcadores inflamatórios, microbiota intestinal e elastografia hepática. Dentre os autores que avaliaram a permeabilidade intestinal, quase a totalidade utilizou biomarcadores, como o manitol e a lactulose, para avaliação do grau de absorção e posterior dosagem urinária (237), sendo dada pouca importância às alterações histomorfológicas e funcionais das proteínas do epitélio intestinal, os quais foram objeto do nosso trabalho. De forma semelhante, dados sobre a fosfatase alcalina intestinal e sua relação com microbiota e obesidade, permanecem escassos na literatura, sendo a maioria das pesquisas realizadas em modelos animais. A própria avaliação da microbiota intestinal na obesidade é outro tema que ainda permanece inconclusivo, apesar desse assunto já estar sendo investigado há mais de uma década.

De forma importante, demonstramos que a fosfatase alcalina intestinal se encontra mais ativa em indivíduos magros, em comparação aos obesos. Além disso, encontramos associações diretas entre esta e os marcadores de resistência insulínica. Demonstramos ainda o provável papel protetor da  $\beta$ -actina e a relação entre determinadas variáveis histomorfométricas e o LPS, constatando que o epitélio intestinal parece estar alterado no fenótipo inflamatório presente na síndrome metabólica. Por fim, os objetivos principais desta pesquisa foram concluídos, pois conseguimos observar que existem associações entre as variáveis estudadas e que estas deveriam ser investigadas futuramente, a fim de permitir melhor entendimento na fisiopatologia da obesidade e de algumas de suas comorbidades.

## REFERÊNCIAS

1. Vigitel. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde; 2017.
2. Mancini. Definições antropométricas da obesidade. Tratado de Obesidade 2010. p. 448-53.
3. Bjorntorp P. Visceral obesity: a "civilization syndrome". *ObesRes.* 1993;1(3):206-22.
4. Lane DM. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP. III): A switch from dietary modification to risk factor assessment. *Current opinion in investigational drugs.* 2001;2(9):1235-6. PubMed PMID: 11717809.
5. Jebb SA. Aetiology of obesity. *British medical bulletin.* 1997;53(2):264-85. PubMed PMID: 9246836.
6. Diet, nutrition, and the prevention of chronic diseases. Report of a WHO Study Group. World Health Organization technical report series. 1990;797:1-204. PubMed PMID: 2124402.
7. Rolls BJ, Shide DJ. The influence of dietary fat on food intake and body weight. *Nutrition reviews.* 1992;50(10):283-90. PubMed PMID: 1436763.
8. Grundy SM. Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. *The American journal of clinical nutrition.* 1998;67(3 Suppl):563S-72S. PubMed PMID: 9497171.
9. Stunkard AJ, Wadden TA. Psychological aspects of severe obesity. *The American journal of clinical nutrition.* 1992;55(2 Suppl):524S-32S. PubMed PMID: 1733121.
10. Araujo EP, Torsoni MA, Velloso LA. Hypothalamic inflammation and obesity. *VitamHorm.* 2010;82:129-43. doi: S0083-6729(10)82007-2 [pii];10.1016/S0083-6729(10)82007-2 [doi].
11. Manco M, Putignani L, Bottazzo GF. Gut microbiota, lipopolysaccharides, and innate immunity in the pathogenesis of obesity and cardiovascular risk. *EndocrRev.* 2010;31(6):817-44. doi: er.2009-0030 [pii];10.1210/er.2009-0030 [doi].
12. Tsukumo DM, Carvalho BM, Carvalho-Filho MA, Saad MJ. Translational research into gut microbiota: new horizons in obesity treatment. *Arq BrasEndocrinolMetabol.* 2009;53(2):139-44. doi: S0004-27302009000200004 [pii].
13. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:415-45. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101322. PubMed PMID: 21219177.
14. Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* 2004;25(1):4-7. PubMed PMID: 14698276.
15. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature.* 2006;444(7121):875-80. doi: 10.1038/nature05487. PubMed PMID: 17167476.

16. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(31):11070-5. doi: 0504978102 [pii];10.1073/pnas.0504978102 [doi].
17. Cani PD, Delzenne NM. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2007;10(6):729-34. doi: 10.1097/MCO.0b013e3282efdebb. PubMed PMID: 18089955.
18. Lyra A, Lahtinen S, Tiihonen K, Ouwehand AC. Intestinal microbiota and overweight. *Beneficial microbes*. 2010;1(4):407-21. doi: 10.3920/BM2010.0030. PubMed PMID: 21831779.
19. Cammarota G, Masucci L, Ianiro G, Bibbo S, D'Ino G, Costamagna G, et al. Randomised clinical trial: faecal microbiota transplantation by colonoscopy vs. vancomycin for the treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;41(9):835-43. doi: 10.1111/apt.13144. PubMed PMID: 25728808.
20. Vermeire S, Joossens M, Verbeke K, Wang J, Machiels K, Sabino J, et al. Donor species richness determines fecal microbiota transplantation success in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2015. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjv203. PubMed PMID: 26519463.
21. Osada T, Ishikawa D, Watanabe S. Fecal microbiota transplantation therapy for patients with gastrointestinal tract diseases. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi*. 2015;112(11):1973-81. doi: 10.11405/nisshoshi.112.1973. PubMed PMID: 26537324.
22. Blaut M, Klaus S. Intestinal microbiota and obesity. *Handbook of experimental pharmacology*. 2012(209):251-73. doi: 10.1007/978-3-642-24716-3\_11. PubMed PMID: 22249818.
23. Cani PD, Delzenne NM. The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacol Ther*. 2011;130(2):202-12. doi: S0163-7258(11)00036-2 [pii];10.1016/j.pharmthera.2011.01.012 [doi].
24. Diamant M, Blaak EE, de Vos WM. Do nutrient-gut-microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes? *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2011;12(4):272-81. doi: 10.1111/j.1467-789X.2010.00797.x. PubMed PMID: 20804522.
25. Backhed F, Crawford PA. Coordinated regulation of the metabolome and lipidome at the host-microbial interface. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1801(3):240-5. doi: 10.1016/j.bbalip.2009.09.009. PubMed PMID: 19782151; PubMed Central PMCID: PMC2823845.
26. Vrieze A, Holleman F, Zoetendal EG, de Vos WM, Hoekstra JB, Nieuwdorp M. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia*. 2010;53(4):606-13. doi: 10.1007/s00125-010-1662-7. PubMed PMID: 20101384; PubMed Central PMCID: PMC2830587.
27. Zhang C, Zhang M, Wang S, Han R, Cao Y, Hua W, et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *The ISME journal*. 2010;4(2):232-41. doi: 10.1038/ismej.2009.112. PubMed PMID: 19865183.

28. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(44):15718-23. doi: 0407076101 [pii];10.1073/pnas.0407076101 [doi].
29. Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(24):15451-5. doi: 10.1073/pnas.202604299. PubMed PMID: 12432102; PubMed Central PMCID: PMC137737.
30. 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;444(7122):1027-31. doi: nature05414 [pii];10.1038/nature05414 [doi].
31. Fleissner CK, Huebel N, Abd El-Bary MM, Loh G, Klaus S, Blaut M. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. *Br J Nutr*. 2010;104(6):919-29. doi: 10.1017/S0007114510001303. PubMed PMID: 20441670.
32. Burcelin R, Serino M, Chabo C, Blasco-Baque V, Amar J. Gut microbiota and diabetes: from pathogenesis to therapeutic perspective. *Acta diabetologica*. 2011;48(4):257-73. doi: 10.1007/s00592-011-0333-6. PubMed PMID: 21964884; PubMed Central PMCID: PMC3224226.
33. Kovacs P, Stumvoll M. Fatty acids and insulin resistance in muscle and liver. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2005;19(4):625-35. doi: 10.1016/j.beem.2005.07.003. PubMed PMID: 16311221.
34. Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology*. 2005;42(5):987-1000. doi: 10.1002/hep.20920. PubMed PMID: 16250043.
35. Wei Y, Chen K, Whaley-Connell AT, Stump CS, Ibdah JA, Sowers JR. Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2008;294(3):R673-80. doi: 10.1152/ajpregu.00561.2007. PubMed PMID: 18094066.
36. Esteve E, Ricart W, Fernandez-Real JM. Gut microbiota interactions with obesity, insulin resistance and type 2 diabetes: did gut microbiote co-evolve with insulin resistance? *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2011;14(5):483-90. doi: 10.1097/MCO.0b013e328348c06d. PubMed PMID: 21681087.
37. Collins SM, Bercik P. The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease. *Gastroenterology*. 2009;136(6):2003-14. doi: 10.1053/j.gastro.2009.01.075. PubMed PMID: 19457424.
38. Tong Q, Ye CP, Jones JE, Elmquist JK, Lowell BB. Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nature neuroscience*. 2008;11(9):998-1000. doi: 10.1038/nn.2167. PubMed PMID: 19160495; PubMed Central PMCID: PMC2662585.
39. Muccioli GG, Naslain D, Backhed F, Reigstad CS, Lambert DM, Delzenne NM, et al. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Mol Syst Biol*. 2010;6:392. doi: msb201046 [pii];10.1038/msb.2010.46 [doi].

40. Geurts L, Lazarevic V, Derrien M, Everard A, Van Roye M, Knauf C, et al. Altered gut microbiota and endocannabinoid system tone in obese and diabetic leptin-resistant mice: impact on apelin regulation in adipose tissue. *Frontiers in microbiology*. 2011;2:149. doi: 10.3389/fmicb.2011.00149. PubMed PMID: 21808634; PubMed Central PMCID: PMC3139240.
41. Sabate JM, Jouet P, Harnois F, Mechler C, Msika S, Grossin M, et al. High prevalence of small intestinal bacterial overgrowth in patients with morbid obesity: a contributor to severe hepatic steatosis. *Obesity surgery*. 2008;18(4):371-7. doi: 10.1007/s11695-007-9398-2. PubMed PMID: 18286348.
42. Cani PD, Delzenne NM. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des*. 2009;15(13):1546-58. PubMed PMID: 19442172.
43. Dandona P, Ghanim H, Bandyopadhyay A, Korzeniewski K, Ling Sia C, Dhindsa S, et al. Insulin suppresses endotoxin-induced oxidative, nitrosative, and inflammatory stress in humans. *Diabetes care*. 2010;33(11):2416-23. doi: 10.2337/dc10-0929. PubMed PMID: 20699433; PubMed Central PMCID: PMC2963505.
44. Mehta NN, McGillicuddy FC, Anderson PD, Hinkle CC, Shah R, Pruscino L, et al. Experimental endotoxemia induces adipose inflammation and insulin resistance in humans. *Diabetes*. 2010;59(1):172-81. doi: 10.2337/db09-0367. PubMed PMID: 19794059; PubMed Central PMCID: PMC2797919.
45. Hua G, Xiaolei L, Weiwei Y, Hao W, Yuangang Z, Dongmei L, et al. Protein phosphatase 2A is involved in the tyrosine hydroxylase phosphorylation regulated by alpha-synuclein. *Neurochemical research*. 2015;40(3):428-37. doi: 10.1007/s11064-014-1477-x. PubMed PMID: 25567480.
46. Brun P, Castagliuolo I, Di L, V, Buda A, Pinzani M, Palu G, et al. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *AmJPhysiol GastrointestLiver Physiol*. 2007;292(2):G518-G25. doi: 00024.2006 [pii];10.1152/ajpgi.00024.2006 [doi].
47. Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher f M, Da Silva NF, Khanolkar M, et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2007;292(3):E740-7. doi: 10.1152/ajpendo.00302.2006. PubMed PMID: 17090751.
48. Ding S, Lund PK. Role of intestinal inflammation as an early event in obesity and insulin resistance. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2011;14(4):328-33. doi: 10.1097/MCO.0b013e3283478727. PubMed PMID: 21587067; PubMed Central PMCID: PMC3650896.
49. Machado ABFR, D D; Peluzio, M C G; Teixeira, T F S;. *Microbiota gastrointestinal; evidências da sua influência na saúde e na doença*. Editora Rubio. 2015;1 edição.
50. Reiquam CW, Allen RP, Akers DR. Normal and Abnormal Small Bowel Lengths: An Analysis of 389 Autopsy Cases in Infants and Children. *American journal of diseases of children*. 1965;109:447-51. PubMed PMID: 14280142.
51. Treves F. Lectures on the Anatomy of the Intestinal Canal and Peritoneum in Man. *British medical journal*. 1885;1(1264):580-3. PubMed PMID: 20751205; PubMed Central PMCID: PMC2255923.

52. Underhill BM. Intestinal length in man. *British medical journal*. 1955;2(4950):1243-6. PubMed PMID: 13269841; PubMed Central PMCID: PMC1981305.
53. Backman L, Hallberg D. Small-intestinal length. An intraoperative study in obesity. *Acta chirurgica Scandinavica*. 1974;140(1):57-63. PubMed PMID: 4819024.
54. Guzman IJ, Fitch LL, Varco RL, Buchwald H. Small bowel length in hyperlipidemia and massive obesity. *The American journal of clinical nutrition*. 1977;30(7):1006-8. PubMed PMID: 879067.
55. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022-3. doi: 4441022a [pii];10.1038/4441022a [doi].
56. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(7):1761-72. doi: db06-1491 [pii];10.2337/db06-1491 [doi].
57. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57(6):1470-81. doi: db07-1403 [pii];10.2337/db07-1403 [doi].
58. Stenling R, Helander HF. Stereological studies on the small intestinal epithelium of the rat. 1. The absorptive cells of the normal duodenum and jejunum. *Cell Tissue Res*. 1981;217(1):11-21.
59. Debnam ES, Ebrahim HY, Swaine DJ. Diabetes mellitus and sugar transport across the brush-border and basolateral membranes of rat jejunal enterocytes. *JPhysiol*. 1990;424:13-25.
60. Zoubi SA, Mayhew TM, Sparrow RA. The small intestine in experimental diabetes: cellular adaptation in crypts and villi at different longitudinal sites. *Virchows Arch*. 1995;426(5):501-7.
61. Fujita Y, Kojima H, Hidaka H, Fujimiya M, Kashiwagi A, Kikkawa R. Increased intestinal glucose absorption and postprandial hyperglycaemia at the early step of glucose intolerance in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Diabetologia*. 1998;41(12):1459-66. doi: 10.1007/s001250051092 [doi].
62. Adachi T, Mori C, Sakurai K, Shihara N, Tsuda K, Yasuda K. Morphological changes and increased sucrase and isomaltase activity in small intestines of insulin-deficient and type 2 diabetic rats. *EndocrJ*. 2003;50(3):271-9.
63. Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Palu G, et al. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2007;292(2):G518-25. doi: 10.1152/ajpgi.00024.2006. PubMed PMID: 17023554.
64. Dyer J, Wood IS, Palejwala A, Ellis A, Shirazi-Beechey SP. Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans. *AmJPhysiol GastrointestLiver Physiol*. 2002;282(2):G241-G8. doi: 10.1152/ajpgi.00310.2001 [doi].
65. Teixeira TF, Collado MC, Ferreira CL, Bressan J, Peluzio MC. Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability. *NutrRes*. 2012;32(9):637-47. doi: S0271-5317(12)00159-5 [pii];10.1016/j.nutres.2012.07.003 [doi].

66. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke JD, Serino M, et al. Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol*. 2014;14:189. doi: 10.1186/s12876-014-0189-7. PubMed PMID: 25407511; PubMed Central PMCID: PMC4253991.
67. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*. 2009;58(8):1091-103. doi: gut.2008.165886 [pii];10.1136/gut.2008.165886 [doi].
68. Genser L, Poitou C, Brot-Laroche E, Rousset M, Vaillant JC, Clement K, et al. [Alteration of intestinal permeability: the missing link between gut microbiota modifications and inflammation in obesity?]. *Med Sci (Paris)*. 2016;32(5):461-9. doi: 10.1051/medsci/20163205012. PubMed PMID: 27225918.
69. Casselbrant A, Elias E, Fandriks L, Wallenius V. Expression of tight-junction proteins in human proximal small intestinal mucosa before and after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Surg Obes Relat Dis*. 2015;11(1):45-53. doi: 10.1016/j.soard.2014.05.009. PubMed PMID: 25264329.
70. Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *The American journal of clinical nutrition*. 2007;86(5):1286-92. doi: 10.1093/ajcn/86.5.1286. PubMed PMID: 17991637.
71. Gonzalez-Quintela A, Alonso M, Campos J, Vizcaino L, Loidi L, Gude F. Determinants of serum concentrations of lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the adult population: the role of obesity. *PloS one*. 2013;8(1):e54600. doi: 10.1371/journal.pone.0054600. PubMed PMID: 23349936; PubMed Central PMCID: PMC3551812.
72. Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Serino M, Luche E, Waget A, Pardo G, et al. Circulating lipopolysaccharide-binding protein (LBP) as a marker of obesity-related insulin resistance. *Int J Obes (Lond)*. 2012;36(11):1442-9. doi: 10.1038/ijo.2011.256. PubMed PMID: 22184060.
73. Sun L, Yu Z, Ye X, Zou S, Li H, Yu D, et al. A marker of endotoxemia is associated with obesity and related metabolic disorders in apparently healthy Chinese. *Diabetes care*. 2010;33(9):1925-32. doi: 10.2337/dc10-0340. PubMed PMID: 20530747; PubMed Central PMCID: PMC2928335.
74. Moreno-Navarrete JM, Sabater M, Ortega F, Ricart W, Fernandez-Real JM. Circulating zonulin, a marker of intestinal permeability, is increased in association with obesity-associated insulin resistance. *PloS one*. 2012;7(5):e37160. doi: 10.1371/journal.pone.0037160. PubMed PMID: 22629362; PubMed Central PMCID: PMC3356365.
75. Brignardello J, Morales P, Diaz E, Romero J, Brunser O, Gotteland M. Pilot study: alterations of intestinal microbiota in obese humans are not associated with colonic inflammation or disturbances of barrier function. *AlimentPharmacolTher*. 2010;32(11-12):1307-14. doi: 10.1111/j.1365-2036.2010.04475.x [doi].
76. Verdam FJ, Rensen SS, Driessen A, Greve JW, Buurman WA. Novel evidence for chronic exposure to endotoxin in human nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2011;45(2):149-52. doi: 10.1097/MCG.0b013e3181e12c24. PubMed PMID: 20661154.

77. Travis S, Menzies I. Intestinal permeability: functional assessment and significance. *ClinSci(Lond)*. 1992;82(5):471-88.
78. DeMeo MT, Mutlu EA, Keshavarzian A, Tobin MC. Intestinal permeation and gastrointestinal disease. *JClinGastroenterol*. 2002;34(4):385-96.
79. Teixeira TF, Souza NC, Chiarello PG, Franceschini SC, Bressan J, Ferreira CL, et al. Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors. *ClinNutr*. 2012;31(5):735-40. doi: S0261-5614(12)00038-6 [pii];10.1016/j.clnu.2012.02.009 [doi].
80. de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, Hartman AL, Rutledge JC, Raybould HE. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *AmJPhysiol GastrointestLiver Physiol*. 2010;299(2):G440-G8. doi: ajpgi.00098.2010 [pii];10.1152/ajpgi.00098.2010 [doi].
81. Bates JM, Mittge E, Kuhlman J, Baden KN, Cheesman SE, Guillemin K. Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Dev Biol*. 2006;297(2):374-86. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.05.006. PubMed PMID: 16781702.
82. Engle MJ, Mahmood A, Alpers DH. Two rat intestinal alkaline phosphatase isoforms with different carboxyl-terminal peptides are both membrane-bound by a glycan phosphatidylinositol linkage. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(20):11935-40. PubMed PMID: 7744844.
83. Nakano T, Inoue I, Alpers DH, Akiba Y, Katayama S, Shinozaki R, et al. Role of lysophosphatidylcholine in brush-border intestinal alkaline phosphatase release and restoration. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2009;297(1):G207-14. doi: 10.1152/ajpgi.90590.2008. PubMed PMID: 19407215; PubMed Central PMCID: PMCPMC3817256.
84. Persson EM, Nilsson RG, Hansson GI, Lofgren LJ, Liback F, Knutson L, et al. A clinical single-pass perfusion investigation of the dynamic in vivo secretory response to a dietary meal in human proximal small intestine. *Pharm Res*. 2006;23(4):742-51. doi: 10.1007/s11095-006-9607-z. PubMed PMID: 16482422.
85. Eliakim R, Mahmood A, Alpers DH. Rat intestinal alkaline phosphatase secretion into lumen and serum is coordinately regulated. *Biochimica et biophysica acta*. 1991;1091(1):1-8. PubMed PMID: 1671644.
86. McConnell RE, Higginbotham JN, Shifrin DA, Jr., Tabb DL, Coffey RJ, Tyska MJ. The enterocyte microvillus is a vesicle-generating organelle. *J Cell Biol*. 2009;185(7):1285-98. doi: 10.1083/jcb.200902147. PubMed PMID: 19564407; PubMed Central PMCID: PMCPMC2712962.
87. Shifrin DA, Jr., McConnell RE, Nambiar R, Higginbotham JN, Coffey RJ, Tyska MJ. Enterocyte microvillus-derived vesicles detoxify bacterial products and regulate epithelial-microbial interactions. *Curr Biol*. 2012;22(7):627-31. doi: 10.1016/j.cub.2012.02.022. PubMed PMID: 22386311; PubMed Central PMCID: PMCPMC3326206.
88. Malo MS, Alam SN, Mostafa G, Zeller SJ, Johnson PV, Mohammad N, et al. Intestinal alkaline phosphatase preserves the normal homeostasis of gut microbiota. *Gut*. 2010;59(11):1476-84. doi: 10.1136/gut.2010.211706. PubMed PMID: 20947883.

89. Malo MS, Moaven O, Muhammad N, Biswas B, Alam SN, Economopoulos KP, et al. Intestinal alkaline phosphatase promotes gut bacterial growth by reducing the concentration of luminal nucleotide triphosphates. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2014;306(10):G826-38. doi: 10.1152/ajpgi.00357.2013. PubMed PMID: 24722905; PubMed Central PMCID: PMC4024727.
90. Vallon V, Muhlbauer B, Osswald H. Adenosine and kidney function. *Physiol Rev*. 2006;86(3):901-40. doi: 10.1152/physrev.00031.2005. PubMed PMID: 16816141.
91. Kaliannan K, Hamarneh SR, Economopoulos KP, Nasrin Alam S, Moaven O, Patel P, et al. Intestinal alkaline phosphatase prevents metabolic syndrome in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(17):7003-8. doi: 10.1073/pnas.1220180110. PubMed PMID: 23569246; PubMed Central PMCID: PMC3637741.
92. Ong JP, Younossi ZM. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. *Clinics in liver disease*. 2007;11(1):1-16, vii. doi: 10.1016/j.cld.2007.02.009. PubMed PMID: 17544968.
93. Jiang W, Wu N, Wang X, Chi Y, Zhang Y, Qiu X, et al. Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with non-alcoholic fatty liver disease. *Scientific reports*. 2015;5:8096. doi: 10.1038/srep08096. PubMed PMID: 25644696; PubMed Central PMCID: PMC4314632.
94. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1999;30(6):1356-62. doi: 10.1002/hep.510300604. PubMed PMID: 10573511.
95. Abu-Shanab A, Quigley EM. The role of the gut microbiota in nonalcoholic fatty liver disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2010;7(12):691-701. doi: 10.1038/nrgastro.2010.172. PubMed PMID: 21045794.
96. Moschen AR, Kaser S, Tilg H. Non-alcoholic steatohepatitis: a microbiota-driven disease. *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24(11):537-45. doi: 10.1016/j.tem.2013.05.009. PubMed PMID: 23827477.
97. Cesaro C, Tiso A, Del Prete A, Cariello R, Tuccillo C, Cotticelli G, et al. Gut microbiota and probiotics in chronic liver diseases. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2011;43(6):431-8. doi: 10.1016/j.dld.2010.10.015. PubMed PMID: 21163715.
98. Mencin A, Kluwe J, Schwabe RF. Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases. *Gut*. 2009;58(5):704-20. doi: 10.1136/gut.2008.156307. PubMed PMID: 19359436; PubMed Central PMCID: PMC2791673.
99. Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood*. 2009;113(7):1399-407. doi: 10.1182/blood-2008-07-019307. PubMed PMID: 18757776; PubMed Central PMCID: PMC2644070.
100. Szabo G, Dolganiuc A, Mandrekar P. Pattern recognition receptors: a contemporary view on liver diseases. *Hepatology*. 2006;44(2):287-98. doi: 10.1002/hep.21308. PubMed PMID: 16871558.

101. Seki E, Brenner DA. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology*. 2008;48(1):322-35. doi: 10.1002/hep.22306. PubMed PMID: 18506843.
102. Su GL, Klein RD, Aminlari A, Zhang HY, Steintraesser L, Alarcon WH, et al. Kupffer cell activation by lipopolysaccharide in rats: role for lipopolysaccharide binding protein and toll-like receptor 4. *Hepatology*. 2000;31(4):932-6. doi: 10.1053/he.2000.5634. PubMed PMID: 10733550.
103. Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2006;26(10):1175-86. doi: 10.1111/j.1478-3231.2006.01342.x. PubMed PMID: 17105582.
104. Sozinov AS. Systemic endotoxemia during chronic viral hepatitis. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2002;133(2):153-5. PubMed PMID: 12428283.
105. Sozinov AS. Possible participation of endotoxin of gram-negative bacteria in pathogenesis of liver damage during viral hepatitis. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2002;133(3):281-4. PubMed PMID: 12360353.
106. Dolganiuc A, Norkina O, Kodys K, Catalano D, Bakis G, Marshall C, et al. Viral and host factors induce macrophage activation and loss of toll-like receptor tolerance in chronic HCV infection. *Gastroenterology*. 2007;133(5):1627-36. doi: 10.1053/j.gastro.2007.08.003. PubMed PMID: 17916356; PubMed Central PMCID: PMC2593079.
107. Schaffert CS, Duryee MJ, Hunter CD, Hamilton BC, 3rd, DeVeney AL, Huerter MM, et al. Alcohol metabolites and lipopolysaccharide: roles in the development and/or progression of alcoholic liver disease. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2009;15(10):1209-18. PubMed PMID: 19291821; PubMed Central PMCID: PMC2658861.
108. Shulkes A, Boden R, Cook I, Gallagher N, Furness JB. Characterization of a pancreatic tumor containing vasoactive intestinal peptide, neurotensin, and pancreatic polypeptide. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1984;58(1):41-8. doi: 10.1210/jcem-58-1-41. PubMed PMID: 6315763.
109. Hauge T, Persson J, Danielsson D. Mucosal bacterial growth in the upper gastrointestinal tract in alcoholics (heavy drinkers). *Digestion*. 1997;58(6):591-5. PubMed PMID: 9438608.
110. Tang Y, Forsyth CB, Farhadi A, Rangan J, Jakate S, Shaikh M, et al. Nitric oxide-mediated intestinal injury is required for alcohol-induced gut leakiness and liver damage. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2009;33(7):1220-30. doi: 10.1111/j.1530-0277.2009.00946.x. PubMed PMID: 19389191; PubMed Central PMCID: PMC2950098.
111. Volynets V, Kuper MA, Strahl S, Maier IB, Spruss A, Wagnerberger S, et al. Nutrition, intestinal permeability, and blood ethanol levels are altered in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Digestive diseases and sciences*. 2012;57(7):1932-41. doi: 10.1007/s10620-012-2112-9. PubMed PMID: 22427130.
112. Li Z, Yang S, Lin H, Huang J, Watkins PA, Moser AB, et al. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2003;37(2):343-50. doi: 10.1053/jhep.2003.50048. PubMed PMID: 12540784.

113. Goel A, Gupta M, Aggarwal R. Gut microbiota and liver disease. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2014;29(6):1139-48. doi: 10.1111/jgh.12556. PubMed PMID: 24547986.
114. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-5. doi: S0016508598003564 [pii].
115. Gao B, Jeong WI, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology*. 2008;47(2):729-36. doi: 10.1002/hep.22034. PubMed PMID: 18167066.
116. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell*. 2002;10(2):417-26. PubMed PMID: 12191486.
117. Elinav E, Strowig T, Kau AL, Henao-Mejia J, Thaiss CA, Booth CJ, et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell*. 2011;145(5):745-57. doi: 10.1016/j.cell.2011.04.022. PubMed PMID: 21565393; PubMed Central PMCID: PMC3140910.
118. Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*. 2012;482(7384):179-85. doi: 10.1038/nature10809. PubMed PMID: 22297845; PubMed Central PMCID: PMC3276682.
119. Ye D, Li FY, Lam KS, Li H, Jia W, Wang Y, et al. Toll-like receptor-4 mediates obesity-induced non-alcoholic steatohepatitis through activation of X-box binding protein-1 in mice. *Gut*. 2012;61(7):1058-67. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300269. PubMed PMID: 22253482.
120. Csak T, Velayudham A, Hritz I, Petrasek J, Levin I, Lippai D, et al. Deficiency in myeloid differentiation factor-2 and toll-like receptor 4 expression attenuates nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in mice. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2011;300(3):G433-41. doi: 10.1152/ajpgi.00163.2009. PubMed PMID: 21233280; PubMed Central PMCID: PMC3302188.
121. Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, Hernandez-Guerra M, Mayorga M, Dominguez-Diez A, et al. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology*. 2001;34(6):1158-63. doi: 10.1053/jhep.2001.29628. PubMed PMID: 11732005.
122. Cope K, Risby T, Diehl AM. Increased gastrointestinal ethanol production in obese mice: implications for fatty liver disease pathogenesis. *Gastroenterology*. 2000;119(5):1340-7. PubMed PMID: 11054393.
123. Sarkola T, Eriksson CJ. Effect of 4-methylpyrazole on endogenous plasma ethanol and methanol levels in humans. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2001;25(4):513-6. PubMed PMID: 11329490.
124. Zhu L, Baker SS, Gill C, Liu W, Alkhoury R, Baker RD, et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: a connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology*. 2013;57(2):601-9. doi: 10.1002/hep.26093. PubMed PMID: 23055155.

125. Baker SS, Baker RD, Liu W, Nowak NJ, Zhu L. Role of alcohol metabolism in non-alcoholic steatohepatitis. *PloS one*. 2010;5(3):e9570. doi: 10.1371/journal.pone.0009570. PubMed PMID: 20221393; PubMed Central PMCID: PMC2833196.
126. Rao R. Endotoxemia and gut barrier dysfunction in alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2009;50(2):638-44. doi: 10.1002/hep.23009. PubMed PMID: 19575462.
127. Leung C, Rivera L, Furness JB, Angus PW. The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2016;13(7):412-25. doi: 10.1038/nrgastro.2016.85. PubMed PMID: 27273168.
128. Lakshmi CP, Ghoshal UC, Kumar S, Goel A, Misra A, Mohindra S, et al. Frequency and factors associated with small intestinal bacterial overgrowth in patients with cirrhosis of the liver and extra hepatic portal venous obstruction. *Digestive diseases and sciences*. 2010;55(4):1142-8. doi: 10.1007/s10620-009-0826-0. PubMed PMID: 19424796.
129. Gupta A, Dhiman RK, Kumari S, Rana S, Agarwal R, Duseja A, et al. Role of small intestinal bacterial overgrowth and delayed gastrointestinal transit time in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy. *Journal of hepatology*. 2010;53(5):849-55. doi: 10.1016/j.jhep.2010.05.017. PubMed PMID: 20675008.
130. Wieland A, Frank DN, Harnke B, Bambha K. Systematic review: microbial dysbiosis and nonalcoholic fatty liver disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2015;42(9):1051-63. doi: 10.1111/apt.13376. PubMed PMID: 26304302.
131. Le Roy T, Llopis M, Lepage P, Bruneau A, Rabot S, Bevilacqua C, et al. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut*. 2013;62(12):1787-94. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303816. PubMed PMID: 23197411.
132. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*. 2012;336(6086):1268-73. doi: 10.1126/science.1223490. PubMed PMID: 22674334; PubMed Central PMCID: PMC4420145.
133. Su L, Wang JH, Cong X, Wang LH, Liu F, Xie XW, et al. Intestinal immune barrier integrity in rats with nonalcoholic hepatic steatosis and steatohepatitis. *Chinese medical journal*. 2012;125(2):306-11. PubMed PMID: 22340564.
134. Raman M, Ahmed I, Gillevet PM, Probert CS, Ratcliffe NM, Smith S, et al. Fecal microbiome and volatile organic compound metabolome in obese humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2013;11(7):868-75 e1-3. doi: 10.1016/j.cgh.2013.02.015. PubMed PMID: 23454028.
135. Yuan J, Baker SS, Liu W, Alkhoury R, Baker RD, Xie J, et al. Endotoxemia unrequired in the pathogenesis of pediatric nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2014;29(6):1292-8. doi: 10.1111/jgh.12510. PubMed PMID: 24372861.
136. Thuy S, Ladurner R, Volynets V, Wagner S, Strahl S, Konigsrainer A, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. *The Journal of nutrition*. 2008;138(8):1452-5. PubMed PMID: 18641190.

137. Ruiz AG, Casafont F, Crespo J, Cayon A, Mayorga M, Estebanez A, et al. Lipopolysaccharide-binding protein plasma levels and liver TNF-alpha gene expression in obese patients: evidence for the potential role of endotoxin in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Obesity surgery*. 2007;17(10):1374-80. doi: 10.1007/s11695-007-9243-7. PubMed PMID: 18000721.
138. Wong VW, Tse CH, Lam TT, Wong GL, Chim AM, Chu WC, et al. Molecular characterization of the fecal microbiota in patients with nonalcoholic steatohepatitis--a longitudinal study. *PloS one*. 2013;8(4):e62885. doi: 10.1371/journal.pone.0062885. PubMed PMID: 23638162; PubMed Central PMCID: PMC3636208.
139. Michail S, Lin M, Frey MR, Fanter R, Paliy O, Hilbush B, et al. Altered gut microbial energy and metabolism in children with non-alcoholic fatty liver disease. *FEMS Microbiol Ecol*. 2015;91(2):1-9. doi: 10.1093/femsec/fiu002. PubMed PMID: 25764541; PubMed Central PMCID: PMCPMC4358749.
140. Mouzaki M, Comelli EM, Arendt BM, Bonengel J, Fung SK, Fischer SE, et al. Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2013;58(1):120-7. doi: 10.1002/hep.26319. PubMed PMID: 23401313.
141. Diabetes SBd. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2013-2014.
142. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18(6):499-502. PubMed PMID: 4337382.
143. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-9. PubMed PMID: 3899825.
144. American Diabetes A. Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes care*. 2014;37 Suppl 1:S14-80. doi: 10.2337/dc14-S014. PubMed PMID: 24357209.
145. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *ProcNatAcadSciUSA*. 2011;108 Suppl 1:4516-22. doi: 1000080107 [pii];10.1073/pnas.1000080107 [doi].
146. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*. 2009;75(23):7537-41. doi: 10.1128/AEM.01541-09. PubMed PMID: 19801464; PubMed Central PMCID: PMCPMC2786419.
147. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, et al. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound in medicine & biology*. 2003;29(12):1705-13. PubMed PMID: 14698338.
148. Saito H, Tada S, Nakamoto N, Kitamura K, Horikawa H, Kurita S, et al. Efficacy of non-invasive elastometry on staging of hepatic fibrosis. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2004;29(2):97-103. doi: 10.1016/j.hepres.2004.03.007. PubMed PMID: 15163431.
149. Marinho R. Utilidade da elastografia hepática transitória (FIBROSCAN®) na cirrose hepática. *GE - J Port Gastrenterol*. 2007;14:15-20.

150. Corpechot C, El Naggar A, Poupon R. Gender and liver: is the liver stiffness weaker in weaker sex? *Hepatology*. 2006;44(2):513-4. doi: 10.1002/hep.21306. PubMed PMID: 16871581.
151. Sasso M, Audiere S, Kemgang A, Gaouar F, Corpechot C, Chazouilleres O, et al. Liver Steatosis Assessed by Controlled Attenuation Parameter (CAP) Measured with the XL Probe of the FibroScan: A Pilot Study Assessing Diagnostic Accuracy. *Ultrasound in medicine & biology*. 2016;42(1):92-103. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2015.08.008. PubMed PMID: 26386476.
152. Sasso M, Tenger-Barna I, Ziol M, Miette V, Fournier C, Sandrin L, et al. Novel controlled attenuation parameter for noninvasive assessment of steatosis using Fibroscan((R)): validation in chronic hepatitis C. *Journal of viral hepatitis*. 2012;19(4):244-53. doi: 10.1111/j.1365-2893.2011.01534.x. PubMed PMID: 22404722.
153. Millonig G, Friedrich S, Adolf S, Fonouni H, Golriz M, Mehrabi A, et al. Liver stiffness is directly influenced by central venous pressure. *Journal of hepatology*. 2010;52(2):206-10. doi: 10.1016/j.jhep.2009.11.018. PubMed PMID: 20022130.
154. Kwok R, Choi KC, Wong GL, Zhang Y, Chan HL, Luk AO, et al. Screening diabetic patients for non-alcoholic fatty liver disease with controlled attenuation parameter and liver stiffness measurements: a prospective cohort study. *Gut*. 2016;65(8):1359-68. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309265. PubMed PMID: 25873639.
155. Tapper EB, Castera L, Afdhal NH. FibroScan (vibration-controlled transient elastography): where does it stand in the United States practice. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2015;13(1):27-36. doi: 10.1016/j.cgh.2014.04.039. PubMed PMID: 24909907.
156. Sasso M, Beaugrand M, de Ledinghen V, Douvin C, Marcellin P, Poupon R, et al. Controlled attenuation parameter (CAP): a novel VCTE guided ultrasonic attenuation measurement for the evaluation of hepatic steatosis: preliminary study and validation in a cohort of patients with chronic liver disease from various causes. *Ultrasound in medicine & biology*. 2010;36(11):1825-35. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2010.07.005. PubMed PMID: 20870345.
157. Castera L, Foucher J, Bernard PH, Carvalho F, Allaix D, Merrouche W, et al. Pitfalls of liver stiffness measurement: a 5-year prospective study of 13,369 examinations. *Hepatology*. 2010;51(3):828-35. doi: 10.1002/hep.23425. PubMed PMID: 20063276.
158. Mikolasevic I, Orlic L, Franjic N, Hauser G, Stimac D, Milic S. Transient elastography (FibroScan((R))) with controlled attenuation parameter in the assessment of liver steatosis and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease - Where do we stand? *World J Gastroenterol*. 2016;22(32):7236-51. doi: 10.3748/wjg.v22.i32.7236. PubMed PMID: 27621571; PubMed Central PMCID: PMC4997649.
159. Sabate JM, Jouet P, Merrouche M, Pouzoulet J, Maillard D, Harnois F, et al. Gastroesophageal reflux in patients with morbid obesity: a role of obstructive sleep apnea syndrome? *Obesity surgery*. 2008;18(11):1479-84. doi: 10.1007/s11695-008-9508-9. PubMed PMID: 18418659.
160. Jou J, Choi SS, Diehl AM. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis*. 2008;28(4):370-9. doi: 10.1055/s-0028-1091981 [doi].

161. Kim KA, Gu W, Lee IA, Joh EH, Kim DH. High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS one*. 2012;7(10):e47713. doi: 10.1371/journal.pone.0047713. PubMed PMID: 23091640; PubMed Central PMCID: PMC3473013.
162. Amar J, Serino M, Lange C, Chabo C, Iacovoni J, Mondot S, et al. Involvement of tissue bacteria in the onset of diabetes in humans: evidence for a concept. *Diabetologia*. 2011;54(12):3055-61. doi: 10.1007/s00125-011-2329-8. PubMed PMID: 21976140.
163. Sato J, Kanazawa A, Ikeda F, Yoshihara T, Goto H, Abe H, et al. Gut dysbiosis and detection of "live gut bacteria" in blood of Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2014;37(8):2343-50. doi: 10.2337/dc13-2817. PubMed PMID: 24824547.
164. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS one*. 2010;5(2):e9085. doi: 10.1371/journal.pone.0009085. PubMed PMID: 20140211; PubMed Central PMCID: PMC2816710.
165. Wu X, Ma C, Han L, Nawaz M, Gao F, Zhang X, et al. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. *Curr Microbiol*. 2010;61(1):69-78. doi: 10.1007/s00284-010-9582-9. PubMed PMID: 20087741.
166. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012;490(7418):55-60. doi: 10.1038/nature11450. PubMed PMID: 23023125.
167. Remely M, Aumueller E, Jahn D, Hippe B, Brath H, Haslberger AG. Microbiota and epigenetic regulation of inflammatory mediators in type 2 diabetes and obesity. *Beneficial microbes*. 2014;5(1):33-43. doi: 10.3920/BM2013.006. PubMed PMID: 24533976.
168. Lambeth SM, Carson T, Lowe J, Ramaraj T, Leff JW, Luo L, et al. Composition, Diversity and Abundance of Gut Microbiome in Prediabetes and Type 2 Diabetes. *J Diabetes Obes*. 2015;2(3):1-7. doi: 10.15436/2376-0949.15.031. PubMed PMID: 26756039; PubMed Central PMCID: PMC4705851.
169. Lippert K, Kedenko L, Antonielli L, Kedenko I, Gemeier C, Leitner M, et al. Gut microbiota dysbiosis associated with glucose metabolism disorders and the metabolic syndrome in older adults. *Beneficial microbes*. 2017;8(4):545-56. doi: 10.3920/BM2016.0184. PubMed PMID: 28701081.
170. Andreasen AS, Pedersen-Skovsgaard T, Berg RM, Svendsen KD, Feldt-Rasmussen B, Pedersen BK, et al. Type 2 diabetes mellitus is associated with impaired cytokine response and adhesion molecule expression in human endotoxemia. *Intensive Care Med*. 2010;36(9):1548-55. doi: 10.1007/s00134-010-1845-1. PubMed PMID: 20229041.
171. Andreasen AS, Kelly M, Berg RM, Moller K, Pedersen BK. Type 2 diabetes is associated with altered NF-kappaB DNA binding activity, JNK phosphorylation, and AMPK phosphorylation in skeletal muscle after LPS. *PLoS one*. 2011;6(9):e23999. doi: 10.1371/journal.pone.0023999. PubMed PMID: 21931634; PubMed Central PMCID: PMC3172218.

172. Horton F, Wright J, Smith L, Hinton PJ, Robertson MD. Increased intestinal permeability to oral chromium (51 Cr) -EDTA in human Type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2014;31(5):559-63. doi: 10.1111/dme.12360. PubMed PMID: 24236770.
173. Cox AJ, Zhang P, Bowden DW, Devereaux B, Davoren PM, Cripps AW, et al. Increased intestinal permeability as a risk factor for type 2 diabetes. *Diabetes Metab*. 2017;43(2):163-6. doi: 10.1016/j.diabet.2016.09.004. PubMed PMID: 27745826.
174. Pedersen C, Ijaz UZ, Gallagher E, Horton F, Ellis RJ, Jaiyeola E, et al. Fecal Enterobacteriales enrichment is associated with increased in vivo intestinal permeability in humans. *Physiol Rep*. 2018;6(7):e13649. doi: 10.14814/phy2.13649. PubMed PMID: 29611319; PubMed Central PMCID: PMC5880877.
175. Vuppalanchi R, Siddiqui MS, Van Natta ML, Hallinan E, Brandman D, Kowdley K, et al. Performance characteristics of vibration-controlled transient elastography for evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2018;67(1):134-44. doi: 10.1002/hep.29489. PubMed PMID: 28859228; PubMed Central PMCID: PMC5739967.
176. Szymczak A, Simon K, Inglot M, Gladysz A. Safety and effectiveness of blind percutaneous liver biopsy: analysis of 1412 procedures. *Hepat Mon*. 2012;12(1):32-7. PubMed PMID: 22451841; PubMed Central PMCID: PMC3298873.
177. Behrens G, Ferral H, Giusto D, Patel J, Van Thiel DH. Transjugular liver biopsy: comparison of sample adequacy with the use of two automated needle systems. *J Vasc Interv Radiol*. 2011;22(3):341-5. doi: 10.1016/j.jvir.2010.10.012. PubMed PMID: 21194967.
178. Kalambokis G, Manousou P, Vibhakorn S, Marelli L, Cholongitas E, Senzolo M, et al. Transjugular liver biopsy--indications, adequacy, quality of specimens, and complications--a systematic review. *Journal of hepatology*. 2007;47(2):284-94. doi: 10.1016/j.jhep.2007.05.001. PubMed PMID: 17561303.
179. Patton HM, Sirlin C, Behling C, Middleton M, Schwimmer JB, Lavine JE. Pediatric nonalcoholic fatty liver disease: a critical appraisal of current data and implications for future research. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2006;43(4):413-27. doi: 10.1097/01.mpg.0000239995.58388.56. PubMed PMID: 17033514.
180. Roulot D, Czernichow S, Le Clesiau H, Costes JL, Vergnaud AC, Beaugrand M. Liver stiffness values in apparently healthy subjects: influence of gender and metabolic syndrome. *Journal of hepatology*. 2008;48(4):606-13. doi: 10.1016/j.jhep.2007.11.020. PubMed PMID: 18222014.
181. Cobbold JF, Taylor-Robinson SD. Liver stiffness values in healthy subjects: implications for clinical practice. *Journal of hepatology*. 2008;48(4):529-31. doi: 10.1016/j.jhep.2008.01.005. PubMed PMID: 18280604.
182. Sirli R, Sporea I, Tudora A, Deleanu A, Popescu A. Transient elastographic evaluation of subjects without known hepatic pathology: does age change the liver stiffness? *J Gastrointest Liver Dis*. 2009;18(1):57-60. PubMed PMID: 19337635.
183. Fraquelli M, Rigamonti C, Casazza G, Conte D, Donato MF, Ronchi G, et al. Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease. *Gut*. 2007;56(7):968-73. doi: 10.1136/gut.2006.111302. PubMed PMID: 17255218; PubMed Central PMCID: PMC1994385.

184. de Barros F, Setubal S, Martinho JM, Leite NC, Guarana T, Monteiro ABS, et al. The Correlation Between Obesity-Related Diseases and Non-alcoholic Fatty Liver Disease in Women in the Pre-operative Evaluation for Bariatric Surgery Assessed by Transient Hepatic Elastography. *Obesity surgery*. 2016;26(9):2089-97. doi: 10.1007/s11695-016-2054-y. PubMed PMID: 26803754.
185. Huh JH, Kim KJ, Kim SU, Han SH, Han KH, Cha BS, et al. Obesity is more closely related with hepatic steatosis and fibrosis measured by transient elastography than metabolic health status. *Metabolism: clinical and experimental*. 2017;66:23-31. doi: 10.1016/j.metabol.2016.10.003. PubMed PMID: 27923446.
186. Malo MS, Biswas S, Abedrapo MA, Yeh L, Chen A, Hodin RA. The pro-inflammatory cytokines, IL-1beta and TNF-alpha, inhibit intestinal alkaline phosphatase gene expression. *DNA Cell Biol*. 2006;25(12):684-95. doi: 10.1089/dna.2006.25.684. PubMed PMID: 17233117.
187. Lalles JP. Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. *Nutrition reviews*. 2010;68(6):323-32. doi: 10.1111/j.1753-4887.2010.00292.x. PubMed PMID: 20536777.
188. Kovatcheva-Datchary P, Arora T. Nutrition, the gut microbiome and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2013;27(1):59-72. doi: 10.1016/j.bpg.2013.03.017. PubMed PMID: 23768553.
189. Khan I, Yasir M, Azhar EI, Kumosani T, Barbour EK, Bibi F, et al. Implication of gut microbiota in human health. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2014;13(8):1325-33. PubMed PMID: 25345506.
190. Nguyen TL, Vieira-Silva S, Liston A, Raes J. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis Model Mech*. 2015;8(1):1-16. doi: 10.1242/dmm.017400. PubMed PMID: 25561744; PubMed Central PMCID: PMC4283646.
191. Dumas ME, Barton RH, Toye A, Cloarec O, Blancher C, Rothwell A, et al. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(33):12511-6. doi: 10.1073/pnas.0601056103. PubMed PMID: 16895997; PubMed Central PMCID: PMC1567909.
192. Rautava S, Luoto R, Salminen S, Isolauri E. Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2012;9(10):565-76. doi: 10.1038/nrgastro.2012.144. PubMed PMID: 22890113.
193. Scott KP, Antoine JM, Midtvedt T, van Hemert S. Manipulating the gut microbiota to maintain health and treat disease. *Microb Ecol Health Dis*. 2015;26:25877. doi: 10.3402/mehd.v26.25877. PubMed PMID: 25651995; PubMed Central PMCID: PMC4315778.
194. Duncan SH, Lopley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(11):1720-4. doi: 10.1038/ijo.2008.155. PubMed PMID: 18779823.
195. Schwiertz A, Taras D, Schafer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(1):190-5. doi: 10.1038/oby.2009.167. PubMed PMID: 19498350.

196. Walters WA, Xu Z, Knight R. Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Lett.* 2014;588(22):4223-33. doi: 10.1016/j.febslet.2014.09.039. PubMed PMID: 25307765; PubMed Central PMCID: PMC499546.
197. Sze MA, Schloss PD. Looking for a Signal in the Noise: Revisiting Obesity and the Microbiome. *MBio.* 2016;7(4). doi: 10.1128/mBio.01018-16. PubMed PMID: 27555308; PubMed Central PMCID: PMC499546.
198. Finucane MM, Sharpston TJ, Laurent TJ, Pollard KS. A taxonomic signature of obesity in the microbiome? Getting to the guts of the matter. *PLoS One.* 2014;9(1):e84689. doi: 10.1371/journal.pone.0084689. PubMed PMID: 24416266; PubMed Central PMCID: PMC499546.
199. Carmody RN, Gerber GK, Luevano JM, Jr., Gatti DM, Somes L, Svenson KL, et al. Diet dominates host genotype in shaping the murine gut microbiota. *Cell Host Microbe.* 2015;17(1):72-84. doi: 10.1016/j.chom.2014.11.010. PubMed PMID: 25532804; PubMed Central PMCID: PMC499546.
200. Gerard P. Gut microbiota and obesity. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(1):147-62. doi: 10.1007/s00018-015-2061-5. PubMed PMID: 26459447.
201. DiBaise JK, Mathur R. Impact of the gut microbiota on development of obesity: current concepts. *Am J Gastroenterol* 2012;Suppl. 1.
202. Caesar R, Tremaroli V, Kovatcheva-Datchary P, Cani PD, Backhed F. Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. *Cell Metab.* 2015;22(4):658-68. doi: 10.1016/j.cmet.2015.07.026. PubMed PMID: 26321659; PubMed Central PMCID: PMC499546.
203. Leone V, Gibbons SM, Martinez K, Hutchison AL, Huang EY, Cham CM, et al. Effects of diurnal variation of gut microbes and high-fat feeding on host circadian clock function and metabolism. *Cell Host Microbe.* 2015;17(5):681-9. doi: 10.1016/j.chom.2015.03.006. PubMed PMID: 25891358; PubMed Central PMCID: PMC499546.
204. Sonnenburg JL, Backhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature.* 2016;535(7610):56-64. doi: 10.1038/nature18846. PubMed PMID: 27383980.
205. Martinez KB, Leone V, Chang EB. Western diets, gut dysbiosis, and metabolic diseases: Are they linked? *Gut Microbes.* 2017;8(2):130-42. doi: 10.1080/19490976.2016.1270811. PubMed PMID: 28059614; PubMed Central PMCID: PMC499546.
206. Wu GD, Compher C, Chen EZ, Smith SA, Shah RD, Bittinger K, et al. Comparative metabolomics in vegans and omnivores reveal constraints on diet-dependent gut microbiota metabolite production. *Gut.* 2016;65(1):63-72. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308209. PubMed PMID: 25431456; PubMed Central PMCID: PMC499546.
207. Donia MS, Fischbach MA. HUMAN MICROBIOTA. Small molecules from the human microbiota. *Science.* 2015;349(6246):1254766. doi: 10.1126/science.1254766. PubMed PMID: 26206939; PubMed Central PMCID: PMC499546.
208. Guo CJ, Chang FY, Wyche TP, Backus KM, Acker TM, Funabashi M, et al. Discovery of Reactive Microbiota-Derived Metabolites that Inhibit Host Proteases. *Cell.* 2017;168(3):517-26 e18. doi: 10.1016/j.cell.2016.12.021. PubMed PMID: 28111075; PubMed Central PMCID: PMC499546.

209. Ott B, Skurk T, Lagkouvardos L, Fischer S, Buttner J, Lichtenegger M, et al. Short-Term Overfeeding with Dairy Cream Does Not Modify Gut Permeability, the Fecal Microbiota, or Glucose Metabolism in Young Healthy Men. *J Nutr*. 2018;148(1):77-85. doi: 10.1093/jn/nxx020. PubMed PMID: 29378051.
210. R Sichieri JE. Validity of a Brazilian frequency questionnaire against dietary recalls and estimated energy intake. *Nutrition Research*. 1998;18(10).
211. Schoeller DA. How accurate is self-reported dietary energy intake? *Nutr Rev*. 1990;48(10):373-9. PubMed PMID: 2082216.
212. Lichtman SW, Pisarska K, Berman ER, Pestone M, Dowling H, Offenbacher E, et al. Discrepancy between self-reported and actual caloric intake and exercise in obese subjects. *N Engl J Med*. 1992;327(27):1893-8. doi: 10.1056/NEJM199212313272701. PubMed PMID: 1454084.
213. Myers RJ, Klesges RC, Eck LH, Hanson CL, Klem ML. Accuracy of self-reports of food intake in obese and normal-weight individuals: effects of obesity on self-reports of dietary intake in adult females. *Am J Clin Nutr*. 1988;48(5):1248-51. PubMed PMID: 3189212.
214. Davis JE, Gabler NK, Walker-Daniels J, Spurlock ME. Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity(SilverSpring)*. 2008;16(6):1248-55. doi: oby2008210 [pii];10.1038/oby.2008.210 [doi].
215. Dibaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA, Rittmann BE. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo ClinProc*. 2008;83(4):460-9. doi: S0025-6196(11)60702-7 [pii];10.4065/83.4.460 [doi].
216. Murphy EF, Cotter PD, Healy S, Marques TM, O'Sullivan O, Fouhy F, et al. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. *Gut*. 2010;59(12):1635-42. doi: 10.1136/gut.2010.215665. PubMed PMID: 20926643.
217. Harte AL, Varma MC, Tripathi G, McGee KC, Al-Daghri NM, Al-Attas OS, et al. High fat intake leads to acute postprandial exposure to circulating endotoxin in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*. 2012;35(2):375-82. doi: 10.2337/dc11-1593. PubMed PMID: 22210577; PubMed Central PMCID: PMC3263907.
218. Deopurkar R, Ghanim H, Friedman J, Abuaysheh S, Sia CL, Mohanty P, et al. Differential effects of cream, glucose, and orange juice on inflammation, endotoxin, and the expression of Toll-like receptor-4 and suppressor of cytokine signaling-3. *Diabetes care*. 2010;33(5):991-7. doi: 10.2337/dc09-1630. PubMed PMID: 20067961; PubMed Central PMCID: PMC2858203.
219. Ghanim H, Abuaysheh S, Sia CL, Korzeniewski K, Chaudhuri A, Fernandez-Real JM, et al. Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of Toll-like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal: implications for insulin resistance. *Diabetes Care*. 2009;32(12):2281-7. doi: 10.2337/dc09-0979. PubMed PMID: 19755625; PubMed Central PMCID: PMC2782991.
220. Beier-Holgersen R, Boesby S. [Effect of early postoperative enteral nutrition on postoperative infections]. *Ugeskr Laeger*. 1998;160(22):3223-6. PubMed PMID: 9621802.

221. Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T, Falony G, Le Chatelier E, Sunagawa S, et al. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature*. 2015;528(7581):262-6. doi: 10.1038/nature15766. PubMed PMID: 26633628; PubMed Central PMCID: PMCPMC4681099.
222. McCreight LJ, Bailey CJ, Pearson ER. Metformin and the gastrointestinal tract. *Diabetologia*. 2016;59(3):426-35. doi: 10.1007/s00125-015-3844-9. PubMed PMID: 26780750; PubMed Central PMCID: PMCPMC4742508.
223. Wu H, Esteve E, Tremaroli V, Khan MT, Caesar R, Manneras-Holm L, et al. Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naïve type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nat Med*. 2017;23(7):850-8. doi: 10.1038/nm.4345. PubMed PMID: 28530702.
224. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergstrom G, Behre CJ, Fagerberg B, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*. 2013;498(7452):99-103. doi: 10.1038/nature12198. PubMed PMID: 23719380.
225. Napolitano A, Miller S, Nicholls AW, Baker D, Van Horn S, Thomas E, et al. Novel gut-based pharmacology of metformin in patients with type 2 diabetes mellitus. *PLoS one*. 2014;9(7):e100778. doi: 10.1371/journal.pone.0100778. PubMed PMID: 24988476; PubMed Central PMCID: PMCPMC4079657.
226. 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*. 2014;63(5):727-35. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303839. PubMed PMID: 23804561.
227. de la Cuesta-Zuluaga J, Mueller NT, Corrales-Agudelo V, Velasquez-Mejia EP, Carmona JA, Abad JM, et al. Metformin Is Associated With Higher Relative Abundance of Mucin-Degrading *Akkermansia muciniphila* and Several Short-Chain Fatty Acid-Producing Microbiota in the Gut. *Diabetes care*. 2017;40(1):54-62. doi: 10.2337/dc16-1324. PubMed PMID: 27999002.
228. Allin KH, Tremaroli V, Caesar R, Jensen BAH, Damgaard MTF, Bahl MI, et al. Aberrant intestinal microbiota in individuals with prediabetes. *Diabetologia*. 2018;61(4):810-20. doi: 10.1007/s00125-018-4550-1. PubMed PMID: 29379988.
229. Ghanim H, Sia CL, Upadhyay M, Korzeniewski K, Viswanathan P, Abuaysheh S, et al. Orange juice neutralizes the proinflammatory effect of a high-fat, high-carbohydrate meal and prevents endotoxin increase and Toll-like receptor expression. *Am J Clin Nutr*. 2010;91(4):940-9. doi: 10.3945/ajcn.2009.28584. PubMed PMID: 20200256; PubMed Central PMCID: PMCPMC2844681.
230. Anderson AS, Haynie KR, McMillan RP, Osterberg KL, Boutagy NE, Frisard MI, et al. Early skeletal muscle adaptations to short-term high-fat diet in humans before changes in insulin sensitivity. *Obesity (Silver Spring)*. 2015;23(4):720-4. doi: 10.1002/oby.21031. PubMed PMID: 25820254; PubMed Central PMCID: PMCPMC4380231.
231. Ghosh R, Gilda JE, Gomes AV. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert Rev Proteomics*. 2014;11(5):549-60. doi: 10.1586/14789450.2014.939635. PubMed PMID: 25059473; PubMed Central PMCID: PMCPMC4791038.

232. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(7):1016-9. PubMed PMID: 10895825.
233. DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA, Rittmann BE. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(4):460-9. doi: 10.4065/83.4.460. PubMed PMID: 18380992.
234. Damms-Machado A, Louis S, Schnitzer A, Volynets V, Rings A, Basrai M, et al. Gut permeability is related to body weight, fatty liver disease, and insulin resistance in obese individuals undergoing weight reduction. *The American journal of clinical nutrition*. 2017;105(1):127-35. doi: 10.3945/ajcn.116.131110. PubMed PMID: 28049662.
235. Bonder MJ, Kurilshikov A, Tigchelaar EF, Mujagic Z, Imhann F, Vila AV, et al. The effect of host genetics on the gut microbiome. *Nat Genet*. 2016;48(11):1407-12. doi: 10.1038/ng.3663. PubMed PMID: 27694959.
236. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science*. 2016;352(6285):560-4. doi: 10.1126/science.aad3503. PubMed PMID: 27126039.
237. Savassi-Rocha AL, Diniz MT, Vilela EG, Diniz Mde F, Sanches SR, da Cunha AS, et al. Changes in intestinal permeability after Roux-en-Y gastric bypass. *Obesity surgery*. 2014;24(2):184-90. doi: 10.1007/s11695-013-1084-y. PubMed PMID: 24101087.

## APÊNDICE A – Obesity, Intestinal Gut Barrier and Microbiota: an Emerging Frontier on Energy Metabolism (Artigo publicado)

*Journal of Gastrointestinal Disorders and Liver Function*



Review Article

OPEN ACCESS

### Obesity, Intestinal Gut Barrier and Microbiota: an Emerging Frontier on Energy Metabolism



Fernanda de Azevedo Marques Lopes<sup>1,2</sup>, Vicente Lopes da Silva Junior<sup>1,2</sup>, Ana Teresa Pugas Carvalho<sup>2</sup>, Rodolfo Albano<sup>3</sup>, Raquel Carvalho Castiglione<sup>4</sup>, Luiz Guilherme Kraemer-Aguiar<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Clinical and Experimental Pathophysiology (FISCLINEX), State University of Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, CEP 20551-030 – Brazil

<sup>2</sup>Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, CEP 20551-030 – Brazil

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, Roberto Alcântara Gomes Biological Institute, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, CEP 20551-030 – Brazil

<sup>4</sup>Laboratory for Clinical and Experimental Research on Vascular Biology (BioVasc), Biomedical Center, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, CEP 20551-030 – Brazil

\*Corresponding author: Luiz Guilherme Kraemer-Aguiar, Rua São Francisco Xavier, 524 – Pavilhão Reitor Haroldo Lisboa da Cunha, térreo (104), CEP 20550-013, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, Tel: 55-21-2334-0703; Fax 55-21-2334-0692; E-mail: [gkraemer@ig.com.br](mailto:gkraemer@ig.com.br)

**Citation:** Kraemer-Aguiar, L.G., et al. Obesity, Intestinal Gut Barrier and Microbiota: An Emerging Frontier on Energy Metabolism. (2016) *J Gastro Dis Liver Func* 2(2): 1- 9.

Received Date: December 17, 2015

Accepted Date: March 09, 2016

Published Date: March 14, 2016

#### Abstract

##### Background & Aims:

An increasing interest in demonstrating differences between intestinal microbiota of obese and lean individuals has been observed during the last decade. The gut microbiota has been related to a number of metabolic abnormalities that could be associated not only to the pathophysiology of obesity, but also to several other highly prevalent diseases.

As researches had shown differences in the prevalence of different bacteria in the gut of these individuals much importance has been given to microbiota composition along intestinal tract. However, few studies have related these findings to changes in the morphological and functional features of the intestinal epithelium.

The intestinal barrier is a complex system and its integrity is essential to prevent against the entrance of harmful microorganisms or molecules to enter the bloodstream, such as LPS (bacterial lipopolysaccharide), a well-known trigger of the low grade inflammatory status. Increased intestinal permeability is one of the proposed mechanisms linking the gut microbiota with metabolic dysfunction, but there are few available data to define which one would be the cause or consequence. This review aims to show the current knowledge about the association between intestinal permeability in obesity and alterations in gut microbiota, in order to bring up a new vision of the pathophysiology of obesity and possibly promote future studies to better elucidate it.

**Methods:** Pub Med searches were performed using terms “microbiota”, “gut permeability” and “obesity”. Articles related to intestinal permeability were selected.

**Results:** Hyperactivation of endogenous cannabinoid system appears to augment gut permeability to LPS which, in turn, seems to enhance chronic inflammation status found in obesity state. Gut microbiota may play an important role in this process, through the regulation of the local immune system and also by regulating the amount of LPS which crosses the gut barrier.

**Conclusions:** Lypopolysaccharide, endocannabinoid system and gut microbiota seem to play an important role in the development of obesity and emerge as a possible target for the treatment of obesity and correlated diseases.

**Keywords:** Obesity; Gut permeability; Microbiota



Copy rights: © 2016 Kraemer-Aguiar, L.G. This is an Open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License.

doi: 10.15436/2471-0601.16.722

1

J Gastrointest Disord Liver Func | volume 2: issue 2

## Introduction

Although a few years ago the role of gut microbiota in human health was ignored, currently a well-known fact in medical sciences is that gut microbes play an important physiological and pathophysiological role in obesity, diabetes, metabolic syndrome, non-alcoholic liver disease, inflammatory bowel diseases and also some other pathologic conditions<sup>[1]</sup>.

In humans, the mechanisms by which gut microbiota influences gut homeostasis remains to be clarified, but it seems that the lipopolysaccharide (LPS), present in the wall of human gut resident bacteria, would be an important factor involved in the regulation of the integrity and function of intestinal epithelium and at unbalanced states related to diseases, it may result in increased gut barrier permeability and its outcomes<sup>[2]</sup>.

By considering obese and normal weight individuals as different from each other based solely on their anthropometric characteristics, we would be too simplistic. Normal weight and obese subjects differ not only in their anthropometry but also in many other aspects, such as inflammatory status and the predominance of some intestinal bacteria phyla<sup>[3]</sup>.

Since a long time ago, obesity is no longer considered a cosmetic problem but a complex disorder. It has been linked to a broad set of other disorders such as arterial hypertension, diabetes mellitus, nonalcoholic fat liver disease and cancer. Therefore, it could be responsible, at least in part, for the great amount of cardiovascular deaths in Western Civilization. Furthermore, obesity is related to rheumatological and respiratory diseases such as osteoarthritis, lumbar spine pain and obstructive sleep apnea. Taken together, these reports show that obesity must be considered as a systemic disorder in excellence<sup>[4]</sup>.

Several studies have already demonstrated possible reasons for the pandemic proportions that obesity has reached, among which we could mention well-known factors such as sedentary life, meals with high energy density, larger food portions, fast-food, eating out-of-home and the psychological stress. In fact, all of them seem to play a crucial role on the pathophysiology of obesity. However, in the past decade some new findings showed some emerging factors related to obesity and its development. Perhaps the most important question that arises is: what are the factors that contribute to the maintenance of obesity and why is it so difficult to treat?

Obesity is a state of chronic subclinical systemic inflammation. Recent evidence has suggested that the gut of obese subjects has differences in host bacteria status with a higher proportion of Firmicutes while in normal weight ones, Bacteroidetes is a more prevalent phylum<sup>[5]</sup>. One of the greatest challenges for researchers on this field nowadays is to clarify whether these differences are the cause or the consequence of obesity, as well as the understanding of the mechanisms involved in this process. The role of the gut in the pathophysiological mechanisms related to obesity is a promising new research avenue that may clarify a number of these issues, not only relating to obesity, but also to other conditions, such as inflammatory bowel disease, type 2 diabetes mellitus and immune-related diseases. This brief review attempts to demonstrate on the basis of the literature data the role of gut permeability in the pathophysiology of obesity-related diseases, focusing especially on its clinical use in future treatments.

## Physiology of Gastrointestinal Tract

Anatomically, the gut may be divided in two regions: the small and the large intestines. Physiologically, both parts take part in the digestion and absorption of dietary nutrients. At the duodenum, the first part of the small intestine is the place where major chemical reactions occur between partially digested food that has already suffered the action of gastric juice and bile-pancreatic secretions. From the contact between the bolus and bile secretions, fat emulsification occurs, leading to micelle formation that potentiates pancreatic lipase activity. In addition to the digestive process, a parallel effect played by GLP-1 and GIP secreting endocrine intestinal cells also occurs with important implications on satiety and energy metabolism. Finally, once the bolus reaches the large intestine, named colon, the digestion and nutrient absorption is almost completed leaving this part of the gut responsible for water absorption.

In addition to its role in digestion it is currently known that the gastrointestinal tract is a "microbiotic system" since it contains about 10<sup>10</sup> to 10<sup>12</sup> CFU / ml of bacteria<sup>[6]</sup>. Recent studies have demonstrated that the intestinal flora plays an important role in nutrition and also on disease, and nowadays, the term "microbiome" is used as a link between the bacterial genes and our own genome and their interplay that could interfere with metabolic processes.

## Obesity and gut epithelium – what is already known?

The link between obesity and the gut reminds of clinical studies performed at the initial stages of obesity research in which scientists believed that this disease could be merely linked to the length of the small intestine suggesting a positive relationship between body adiposity and intestinal length. This theory was tested in these clinical studies that evaluated intestines from autopsies of obese and normal weight individuals revealing that the data were highly variable, depending on the method and measurements employed<sup>[6-9]</sup>.

On the 70s, the most important study was designed and performed by Guzman and co-workers<sup>[10]</sup> who measured the length of the small intestine during intestinal bypass surgery in 272 morbidly obese patients during jejunoileal surgery and compared it to the length of the small intestine measured on 121 non-obese patients who had undergone partial ileal resection for treating hyperlipidemia. They provided evidence that there was no significant difference in the length of intestines between obese and non-obese patients.

In the light of these data, researchers concluded that the differences between obese and normal weight subjects were not related to the length of the small intestine itself. Therefore, another hypothesis aroused. Would the specific morphological and functional features that alter the structure of the epithelium play a role on obesity? The first experiments to investigate this were conducted on animal models and enabled us to partially prove this thesis.

In 2005, Ley and co-workers demonstrated that obese mice had some differences in the composition of their intestinal microbiota as they observed that Bacteroidetes was the least prevalent phylum in the intestines (around 50% less) of obese animals while a higher prevalence of Firmicutes was concurrently noticed in the normal weight ones. Additionally, the investigators subjected obese animals to a weight-loss diet and showed that their microbiota became very similar to that of nor-

mal weight mice<sup>[11]</sup>.

A similar characteristic of the intestinal microbiota was observed in humans when Ley and co-workers, in 2006, indicated that the development of obesity has a microbial component. In this study, they found that the relative proportion of Bacteroidetes is decreased in obese people when compared to lean ones and, more importantly, that this proportion increases with weight loss with different types of low-calorie diet<sup>[3]</sup>.

In one study, Backhed and collaborators compared mice with and without host bacteria in the gut, the latter group also known as germ-free animals. Mice colonized with host bacteria had increased body fat content in relation to their germ-free counterparts. Surprisingly, the animals with host bacteria had 30% less caloric intake and a higher resting metabolism than germ-free mice. In this experimental model, these findings suggested a major role of microbiota on energy metabolism<sup>[12]</sup>. Subsequently, another group grounded this hypothesis and demonstrated by the colonization of "germ-free" mice with microbiota from obese mice a significant increase in fat mass compared to those mice colonized with microbiota from lean ones<sup>[13]</sup>. However, as shown in table 1 some contradictions still exist. A possible explanation for this could be related to the differences in the methods employed to detect these bacteria. Moreover, although the majority of the results have differences in the proportion of bacterial groups, it is still not possible to identify whether any group of specific microorganisms directly contributes to the development of obesity and metabolic disorders<sup>[14]</sup>.

**Table 1:** Alterations detected in the human gastrointestinal microbiota in obese and overweight subjects. Results from comparisons between obese or overweight subjects with normal weight controls

Reference	Bacterial groups/species																	
	Eubacteria	Bacteroides/Firmicutes-ratio	Bacteroidetes				Firmicutes											
			Bacteroidetes	Bacteroides	Bacteroides fragilis	Prevotella	Firmicutes	Clostridium coccoidesgroup	Roseburia-Eubacteriumrectale	Clostridium leptumgroup	Ruminococcusflavifaciens subgroup	Clostridium histolyticumgroup	Eubacteriumcylindroides	Veillonella	Clostridium perfringens	Lactobacillus, Lactobacillus-Enterococcus	Staphylococcus, Staphylococcus aureus	Veillonella spp.
Armougom et al., 2009			↓			↔											↑	
Collado et al., 2008	↔			↑	↔								↔					↑
Duncan et al., 2008	↔			↔														
Larsen et al., 2010		↔																
Ley et al., 2006		↓	↓			↑												
Malinen et al., 2010	↔						↔										↔	↔
Santacruz et al., 2010	↔			↓			↔		↔								↑	↑
Schwartz et al., 2010	↔	↑	↑	↑		↔	↓	↔	↓	↓			↔	↔			↔	↔
Tiihonen et al., 2010	↔		↔				↔								↔		↔	
Turnbaugh et al., 2009			↓			↔												
Zhang et al., 2009			↔			↑												

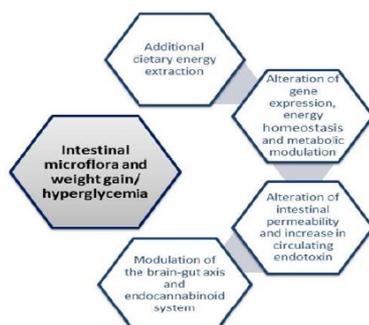
The arrows indicate increased (↑), decreased (↓) or unaltered (↔) quantities or relative abundances in obese subjects. Source: Adapted from Lyra et al., 2010 (ref. 14).

Studies on microbiome have expanded in order to elucidate its role in a great number of other diseases. Fecal microbiota transplantation is a successful therapy for patients with refractory *Clostridium difficile* infections<sup>[15]</sup> and it has also been suggested as a treatment option for inflammatory bowel disease, given a role for intestinal microbiota in this disease<sup>[16,17]</sup>. Vermeire and colleagues assessed the impact of fecal microbiota transplantation in patients with inflammatory bowel disease and studied predictors of clinical (non)response in microbial profiles of donors and patients and concluded that fecal microbiota transplantation led to endoscopic and long-term (> 2 years) remission in 2 out of 8 ulcerative colitis patients<sup>[18]</sup>.

Many other experimental and clinical studies that have been published in the last years were able to confirm that the composition of the intestinal flora shows differences between lean and obese subjects<sup>[18-22]</sup>. However, there is still one not well elucidated point: how are these changes related to obesity?

Over the years, many mechanisms have been proposed in an attempt to explain this relationship. Possible mechanisms relating obesity to intestinal microbiome are depicted in figure 1. The most relevant ones suggest that gut flora may influence many aspects of gut homeostasis such as the capacity for energy extraction from food, the regulation of host genes that modulate

how energy could be used or stored and the modulation of LPS levels that leads to a chronic local and systemic subclinical inflammation, to a prolonged time in gut transit time and also to an altered permeability of the intestinal epithelium<sup>[5,23,24]</sup>. All of these mechanisms would converge to increase the likelihood of developing obesity among individuals who show higher gut permeability that would enable LPS to cross the gut barrier in great amounts and reach the blood stream, causing low grade systemic inflammation, a subsequent altered regulation of energy metabolism and hunger-satiety homeostasis and weight gain.



**Figure 1:** Proposed mechanisms linking obesity and intestinal microbiota

#### Additional dietary energy extraction

One hypothesis proposed to explain why greater energy extraction from food by bacteria could be involved in obesity pathophysiology is related to the transfer of hydrogens. Oxidation of this molecule increases the formation of methane which, in turn, facilitates the fermentation of polysaccharides from vegetables and other sources. The accelerated fermentation stimulates hydrolysis of organic material that normally cannot be digested, leading them free for the production of acetate, which can be absorbed and easily used by the host. It has been shown that obese subjects have greater amount of *Archea* and *Proteobacteria* which indicates that this microbiota would favor the formation of methane<sup>[25]</sup> and the above mentioned cycle.

Increments in intestinal microvasculature may result in increased intestinal nutrients absorption. It was demonstrated that, by exposing germ free animals to bacteria, and turning them into colonized animals, an increased intestinal microvasculature occurred possibly due to interactions of bacteria with the host immune system cells<sup>[26]</sup>.

Another important aspect is related to differences in the production of acetate and propionate according to host microbiota. Germ-free animals inoculated with microbiota from obese animals produced greater amounts of acetate and propionate than those inoculated with microbiota from lean animals<sup>[13]</sup>. The resultant of this inoculation was a greater weight gain on the former animals. In addition, it was shown that the consumption of diet with high proportions of fat and sugar, those classically used to induce obesity in animal models, did not cause obesity in germ-free animals<sup>[27]</sup>. As a counterpoint, the hypothesis that the absence of microbials in germ free animals would give protection against weight gain was challenged by Fleissner and coworkers<sup>[28]</sup>. They have shown that the fatty acid profile was

more important than the amount of macronutrients in determining the extent of protection to weight gain by the germ free animals, which disputes the additional dietary energy extraction hypothesis and makes this issue more complex than previously thought<sup>[29]</sup>.

#### Alteration of gene expression, energy homeostasis and metabolic modulation

The ectopic fat accumulation in sites, such as the liver and the skeletal muscle, influences the balance of glycidic and lipidic metabolism, through the development of insulin resistance<sup>[30,31]</sup>. There is evidence that the microbiota plays an important role in the regulation of intermediary metabolism in the host influencing gene expression in these organs<sup>[32]</sup>.

Microbiota studies have shown some alterations in intestinal expression of FIAF (*named fasting-induced adipose factor*) protein that interferes with the metabolism of intestinal fatty acids<sup>[12]</sup>. Additionally, another study showed changes in gene expression of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1), which are both nuclear regulators of lipogenic enzymes, able to favor the triacylglycerol accumulation in the liver tissue<sup>[33]</sup>.

#### The Endocannabinoid System

The endocannabinoid system (eCB) is the machinery formed by the two main endocannabinoids - anandamide and 2-arachidonoyl glycerol (2AG), their receptors (CB1 and CB2) and enzymes involved in the biosynthesis and degradation of its ligands. The components of this system are expressed from the brain to several other tissues, including liver and gastrointestinal tract. Endocannabinoids are synthesized from arachidonic acid and are rapidly hydrolyzed to inactive compounds by catalytic action of specific enzymes<sup>[34]</sup>. CB1 receptor is the best characterized target of exogenous and endogenous cannabinoids in the modulation of neuroendocrine and metabolic responses. Its expression has already been demonstrated in a variety of tissues such as adipocytes, muscle and liver<sup>[35-37]</sup>. Additionally, the eCB is present in the gastrointestinal tract, where it has an important action on modulation of motility, inflammation and secretion<sup>[38]</sup>.

Endocannabinoids are very lipophilic, so they cannot be stored in vesicles like insulin and neurotransmitters. As a result of this, the regulation of the eCB is tightly controlled by their synthesis, release, uptake and degradation<sup>[34]</sup>, suggesting that its action occurs on demand.

Any anandamide (firstly identified in 1992) such as 2AG (identified in 1995) modulates neuronal activity through the backward elimination process of neurotransmitter release. In the central nervous system, endocannabinoids can act as neurotransmitters when post-synaptic release of endocannabinoids targets pre-synaptic neurons and activates CB1 receptor, in a process known as retrograde signaling<sup>[39,40]</sup>. In this process, the action of neurotransmitters at post-synaptic neurons stimulates the rapid and transient production of endocannabinoids on demand from phospholipid precursors present in the cell membrane. The overall effect is a decrease in the release of neurotransmitters such as glutamate and GABA but, in fact, the final result of the action of endocannabinoids depends on whether the specific synapse is an excitatory or inhibitory one, resulting respectively in suppression or release of neuronal transmission<sup>[41]</sup>.

The CB1 receptor is the one that is related to anabolic functions of endocannabinoids, with broad and abundant distribution not only in the brain but also in a variety of tissues. The action of endocannabinoids on CB1 receptor results in an increased appetite, weight gain, lipogenesis and higher insulin sensitivity<sup>[42]</sup>. In the hypothalamus, endocannabinoids increase the production of orexigenic neurotransmitters while reducing anorexigenic ones. In the reward center, endocannabinoids promote motivation to demand and food consumption and increase for the consumption of highly palatable foods. In the brainstem, they block the nausea and satiety signals transmitted from the vagus nerve. Peripherally, endocannabinoids facilitate the absorption of nutrients in the gut, stimulate lipogenesis and compromise the glucose uptake in muscle. It was recently shown that the liver also expressed CB1 receptors, promoting the induction of Steroid Regulator Element Binding Protein-1 (SREBP-1) and, consequently, hepatic lipogenesis<sup>[37]</sup>. Molecular mediators such as SREBP-1 are involved in the pathophysiology of steatosis and hepatic injury in states of obesity and insulin resistance<sup>[43]</sup>. This is a transcription factor that acts in the cascade of hepatic lipogenesis via transcription of the genes of key enzymes such as acetyl-CoA carboxylase-1 (ACC1) and fatty acid synthase (FAS)<sup>[37,44]</sup>.

Some studies found that obesity is characterized by greater eCB tone. This finding could be verified by eCB plasma levels, by an altered expression of the CB1 receptor and also by increased eCB levels in adipose tissue<sup>[35,45-47]</sup>. Interestingly, it had already been demonstrated that LPS was able to control the synthesis of eCB components both *in vivo*<sup>[48]</sup> and *in vitro*<sup>[49]</sup> through mechanisms that are dependent on LPS receptor signaling<sup>[50]</sup>.

One study demonstrated that obese mice treated with the CB1 receptor antagonist (SR141716A) for 12 days exhibited reduced gut permeability as shown by their reduced plasma LPS levels compared to controls. Moreover, it was found that this reduction was possible through a mechanism linked to the improvement of gut barrier function which was inferred from changes in the distribution and localization of tight junction proteins [zonula occludens -1 (ZO1) and occludin]<sup>[51]</sup>. In the same study, the authors also found that the reduction on gut permeability was associated with decreased expression of the hepatic inflammatory markers tumour necrosis factor- $\alpha$ , plasminogen-activator inhibitor-1 and toll-like receptor-4 mRNA. Other studies have also shown that *in vivo* colonic CB1 mRNA expression was reduced in gut microbiota models known to improve gut permeability and that mice treated with a CB1 receptor antagonist exhibited improved gut permeability<sup>[52-54]</sup>. According to all of these findings, Muccioli and colleagues hypothesized that the intestinal eCB system controls gut barrier function through a CB1-dependent mechanism<sup>[51]</sup>. However, plasma LPS levels have also been suggested as a factor related to the development of gut barrier dysfunction<sup>[55,56]</sup>. In an attempt to elucidate this problem, the cited authors applied simultaneously a CB1-receptor agonist (HU-210) and LPS, and observed a reduction in the mRNA expression of two tight junction proteins (occludin and ZO-1). In contrast, the CB2 receptor antagonist (SR144528) did not alter gut permeability<sup>[51]</sup>.

Gut permeability may play an important and precocious role in the pathophysiology of obesity and low-grade inflammation. In the last decades, the eCB emerged as a new metabolic pathway that could be involved in gut barrier dysfunc-

tions, increasing gut permeability. As already mentioned, the eCB system comprehends bioactive lipids that bind to cannabinoid receptors eliciting cell signaling. The well-characterized lipids that elicit these responses are anandamide and 2-AG<sup>[57]</sup>. Intrinsic eCBs mediators are synthesized by specific enzymes such as NAPE-PLD (N-acyl-phosphatidylethanolamine) and the effect of non-digestible nutrients with intrinsic prebiotic properties on host pathophysiology related to obesity seems to be important in this relationship. ECBS system acts by activation of protein-G-coupled receptors, namely CB1 and CB2 that are expressed in diverse patterns among different cell types<sup>[58]</sup>. The effects of eCBs on metabolism are thought to be mediated primarily by CB1 and CB2 receptors. Studies have shown that stimulation of the eCB system increases food intake and that treatment with a CB1 antagonist in humans reduced food intake and decreases body weight, although detrimental effects on mood have been observed<sup>[59]</sup>.

In an experiment, Hind and colleagues demonstrated that anandamide (AEA) and oleoylethanolamide (OEA) (another eCB mediator) decreased blood brain barrier permeability and that this action was probably mediated by cannabinoid CB2 receptors, transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels, calcitonin gene-regulated peptide (CGRP) receptor and PPAR $\alpha$ <sup>[60]</sup>. Moreover, it was recently proposed that the eCB system could be one of the ways that mediate communication between the gut and adipose tissue<sup>[51]</sup>.

The eCB system appears to link gut barrier function, adipose tissue composition and the gut microbiota, as previously demonstrated by Muccioli and co-workers. They showed that the eCB system was implicated in gut barrier alterations and increased gut permeability observed in obesity by observing that colonic CB1 mRNA levels were modified in animal models of gut microbiota modulation which included germ-free mice, antibiotic treatment, MyD88 (an important adaptor to Toll-like-4 receptor transduction) knockout mice, high-fat diet-treated mice and prebiotic-treated mice, suggesting that the gut microbiota selectively modulates CB1 colonic mRNA<sup>[51]</sup>. Therefore, there are strong evidences that the gut flora plays an important relationship with the permeability of the intestinal epithelium although the full mechanisms involved in this relationship still need further clarification. Among the hypotheses tested, the most accepted one is the role of LPS in the induction of chronic inflammation and in changing junctional proteins.

#### Experimental studies related to intestinal permeability

The importance of establishing the exact relationship between obesity and increased gut permeability is clear since damaging molecules such as LPS could be crossing the barrier through the paracellular route in obese subjects. In obese rats, the abnormal distribution of junctional proteins (such as zonulin and occludin) in the small intestine<sup>[29]</sup>, as well as the high inflammatory grade influenced by gut microbiota<sup>[30]</sup>, might support this hypothesis.

Animal studies have demonstrated morphological changes and increased gut permeability associated with obesity, but they did not indicate whether these changes occur in the small intestine or in the colon. In these models, it was suggested that there would be a change in the expression of junctional proteins of the intestinal epithelium, leading to greater permeation to endotoxins, as well as qualitative and quantitative changes in

the crypts, villi and local enzymes<sup>[61,62]</sup>. However, in humans this relationship has yet to be demonstrated.

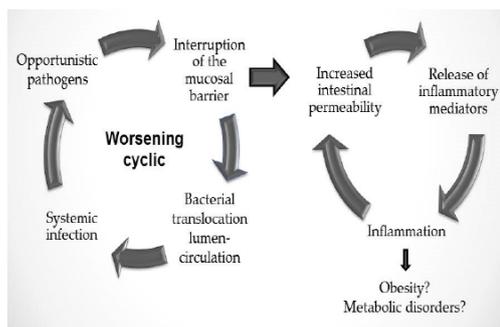
Other animal studies analyzed the morphology of the intestinal epithelium of diabetic rats and compared it to controls. Researchers showed that diabetic rats presented cell hypertrophy and hyperplasia at the small intestine, directly influencing the degree of nutrient absorption and, consequently, the pathophysiological process of diabetes mellitus<sup>[63-66]</sup>.

Besides the morphological alterations observed in most studies using diabetic rats, Adachi and co-workers<sup>[67]</sup> found a significant increase in the expression and activity of the sucrase-isomaltase complex in the brush border of enterocytes in obese mice with hyperglycemia. Sucrase and isomaltase are both disaccharidases found in the small intestine epithelium and have a major role in the final stage of carbohydrate digestion.

In addition, Brun and co-workers showed that obese animals had a higher permeability of the intestinal barrier, a higher endotoxemia of the portal system and a higher level of proinflammatory cytokines in comparison to control animals. This finding reinforces the hypothesis of a possible link between obesity and intestinal morphofunctional changes<sup>[68]</sup>. Subsequently, these changes were observed in other animal studies that combined changes in gut microbiota composition and related them to an increased permeability and absorption of LPS<sup>[62,69]</sup>.

One of the ways we have to neutralize LPS action is through alkaline phosphatase activity. This is an important enzyme in intestinal homeostasis and, although its mechanism of action is not actually well understood, it is also known that it is able to detoxify LPS from gram negative bacteria and thus prevent translocation of these microorganisms into the bloodstream. De La Serre and colleagues tested obese diabetic rats and were able to observe a decrease in the activity of intestinal alkaline phosphatase in these animals, which could explain the increased levels of LPS<sup>[70]</sup>. Subsequently, Dyer and coworkers showed an increase in monosaccharide transporters in the intestines of diabetic subjects confirming that these alterations also occurred in humans<sup>[71]</sup>.

In summary, the understanding of the importance of the link between obesity and intestinal permeability and how it influences intestinal homeostasis may add knowledge to pathophysiology of obesity and metabolic diseases. Figure 2 summarizes this pathophysiology.



**Figure 2:** Intestinal homeostasis depends on intestinal permeability

### Clinical techniques to investigate gut permeability

Most studies on gut permeability are performed in experimental models while in humans this evaluation is limited to techniques dependent on invasive procedures. Several studies have attempted to address this issue and currently the use of *Ussing Chambers* can bring new knowledge to this area. These devices are able to measure the electrical resistance through the mucosa of intestinal biopsies<sup>[72]</sup>. They provide a system to measure the transport of nutrients, ions and drugs across various epithelial tissues<sup>[73]</sup>. In this system, the two half chambers are separated by the epithelia (sheet of mucosa or monolayer of epithelial cells grown on permeable supports) and, additionally, electrodes are placed near the tissue. The ion movement through these barriers produces a difference in potential across the epithelium that is measured using voltage electrodes. Based on this premise, differences in potential reflect the movement of ions across the membrane and thus permeability.

The transport by renal epithelium influences what will be excreted in the urine and another way to indirectly investigate the absorptive capacity of the guts is through urinary dosage of previously ingested and absorbed substances. Ideally, a good marker of renal function may not suffer absorption or secretion by the renal tubules. Experimentally, this compound is represented by inulin, however, in clinical practice; the endogenous substance that is closer to the ideal is creatinine. In fact, the kidneys are the final determinants of what will be excreted since the glomerular filtrate can be quite modified when passing through the epithelium of renal tubules, where a wide variety of carriers are expressed. As a confounding factor in the study of renal excretion, it has yet been demonstrated that obesity alters expression of kidney transporters<sup>[74]</sup>. However, by studying renal excretion one can minimize the technical difficulty to investigate gut permeability *in situ*. The indirect measure of gut permeability by oral ingestion of some substances and the subsequent dosage of these compounds at the excreted urine involves the knowledge of the mechanism that allows the passages of molecules from the lumen across the epithelial membrane, called transepithelial transport. This transport is divided into transcellular transport (through the cells) and paracellular one (between the cells)<sup>[75]</sup>. The size and solubility of the molecule and its regulation through junctional proteins are key points that define the substance's permeation route.

The basic rule in testing gut permeability by levels of urinary excretion is that, when there is an altered mucosal barrier which determines increased gut permeability, there will be a concomitant increase in the urinary excretion of the substance tested<sup>[76]</sup>. There are some substances that may be used for this and the polyethylene glycols, water soluble contrasts, radioactive labeled substances and sugars (mannitol, lactulose, sucrose, sucralose, xylose, cellobiose) are the most widely used<sup>[77]</sup>.

In humans, there are conflicting results in the literature regarding the use of these substances for evaluating gut permeability. Brignardello and coworkers analyzed obese subjects and compared them to normal weight controls and found no differences in the excretion of the above mentioned sugars<sup>[77]</sup>. In contrast, Teixeira and coworkers studied two groups of women, obese and controls, and demonstrated that obese women were able to excrete larger quantities of lactulose and mannitol than controls for the same amount of ingested sugars, suggesting thereby that obese women had increased gut permeability<sup>[78]</sup>.

There are other indirect forms of evaluating gut permeability such as the measurement of myosin light chain phosphorylation in tissue samples of intestinal biopsies as well as the activity of myeloperoxidase which determines the degree of inflammation and neutrophilic permeation. Cytokines, such as tumour necrosis-alpha and interferon-gamma, are associated with an increased activity of the light chain myosin kinase, leading to the phosphorylation of myosin light chain and, as a result, cytoskeleton contraction. This contraction would cause a breakage of the "tight junctions" in the intestinal epithelium with resultant increased gut permeability. All of these changes were found in mice prone to obesity<sup>[70]</sup> although clinically it has not yet been tested. Further studies are required in this field to determine a more accurate, easier, non-invasive method for assessing gut permeability.

The great difficulty to study the relationship between obesity and gut microbiota is that the majority of studies on this issue have cross-sectional design. Moreover, the majority of studies correlating changes in colonic intestinal microbiota and obesity have only analyzed the composition of these microorganisms, without testing its association to gut permeability. Indeed, less attention has been given to small intestine microbiota, possibly because of the difficulty in obtaining samples of this organ in humans<sup>[47]</sup>. However, it has been shown that the major gut permeability changes occur especially in the small intestine.

### Conclusions

The association between obesity and increased gut permeability is still controversial despite current evidence suggesting that this association may be positive. Recent data showing that gut microbiota of obese and normal weight subjects differ from each other transformed the intestinal epithelium from something of unknown relevance and of little significance for the pathophysiology of obesity into a site that needs investigation. This investigation should focus both on the functional aspects of the intestinal epithelium itself and the composition of its microbiota. In this review, we tried to definitively establish the relationship between obesity, microbiota and gut permeability in humans. However, currently there is a lack of clinical data that prevents us to establish their exact association or to put the blame on one these factors. Therefore, there is much that we must find out so not only new techniques, but also new study designs, either cross-sectional or longitudinal and/or also interventional ones are needed to clarify the association between obesity, the microbiota and gut permeability.

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

### References

1. Barrett, K.E. The world within--impact of the intestinal microbiota on whole body physiology and pathophysiology. (2009) *J Physiol* 587(Pt 17): 4151.
2. Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. (2007) *Diabetes* 56(7): 1761-1772.
3. Ley, R.E., Tumbaugh, P.J., Klein, S., et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. (2006) *Nature* 444(7122): 1022-1023.
4. Manco, M., Putignani, L., Bottazzo, G.F. Gut microbiota, lipopolysaccharides, and innate immunity in the pathogenesis of obesity and

- cardiovascular risk. (2010) *Endocr Rev* 31(6): 817-844.
5. Cani, P.D., Delzenne, N.M. The gut microbiome as therapeutic target. (2011) *Pharmacol Ther* 130(2): 202-212.
6. Reiquam, C.W., Allen, R.P., Akers, D.R. Normal and Abnormal Small Bowel Lengths: An Analysis of 389 Autopsy Cases in Infants and Children. (1965) *Am J Dis Child* 109: 447-451.
7. Treves, F. Lectures on the Anatomy of the Intestinal Canal and Peritoneum in Man. (1885) *Br Med J* 1(1264): 580-583.
8. Underhill, B.M. Intestinal length in man. (1955) *Br Med J* 2(4950): 1243-1246.
9. Backman, L., Hallberg, D. Small-intestinal length. An intraoperative study in obesity. (1974) *Acta Chir Scand* 140(1): 57-63.
10. Guzman, I.J., Fitch, L.L., Varco, R.L., et al. (1977) Small bowel length in hyperlipidemia and massive obesity. *Am J Clin Nutr* 30(7): 1006-1008.
11. Ley, R.E., Backhed, F., Tumbaugh, P., et al. Obesity alters gut microbial ecology. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(31): 11070-11075.
12. Backhed, F., Ding, H., Wang, T., et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(44): 15718-15723.
13. Tumbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. (2006) *Nature* 444(7122): 1027-1031.
14. Lyra, A., Lahtinen, S., Tiihonen, K., et al. Intestinal microbiota and overweight. (2010) *Beneficial microbes* 1(4): 407-421.
15. Cammarota, G., Masucci, L., Ianiro, G., Bibbo, S., et al. Randomised clinical trial: faecal microbiota transplantation by colonoscopy vs. vancomycin for the treatment of recurrent *Clostridium difficile* infection. (2015) *Aliment Pharmacol Ther* 41(9): 835-843.
16. Vermeire, S., Joossens, M., Verbeke, K., et al. Donor species richness determines fecal microbiota transplantation success in inflammatory bowel disease. (2015) *J Crohns Colitis*.
17. Osada, T., Ishikawa, D., Watanabe, S. Fecal microbiota transplantation therapy for patients with gastrointestinal tract diseases. (2015) *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 112(11): 1973-1981.
18. Cani, P.D., Delzenne, N.M. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. (2007) *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10(6): 729-734.
19. Nadal, I., Santacruz, A., Marcos, A., et al. Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. (2009) *Int J Obes (Lond)* 33(7): 758-767.
20. Santacruz, A., Marcos, A., Wamberg, J., et al. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. (2009) *Obesity (Silver Spring)* 17(10): 1906-1915.
21. Duncan, S.H., Lobeley, G.E., Holtrop, G., et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. (2008) *Int J Obes (Lond)* 32(11): 1720-1724.
22. Tumbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunenko, T., et al. A core guts microbiome in obese and lean twins. (2009) *Nature* 457(7228): 480-484.
23. Tsukumo, D.M., Carvalho, B.M., Carvalho-Filho, M.A., et al. Translational research into gut microbiota: new horizons in obesity treatment. (2009) *Arq Bras Endocrinol Metabol* 53(2): 139-144.
24. Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. (2007) *Diabetes* 56(7): 1761-1772.
25. Zhang, C., Zhang, M., Wang, S., et al. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. (2010) *The ISME journal* 4(2): 232-241.
26. Stappenbeck, T.S., Hooper, L.V., Gordon, J.I. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes

- via Paneth cells. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24): 15451-1545.
27. Backhed, F., Manchester, J.K., Semenkovich, C.F., et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(3): 979-984.
28. Fleissner, C.K., Huebel, N., Abd El-Bary, M.M., et al. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. (2010) *Br J Nutr* 104(6): 919-929.
29. Murphy, E.F., Cotter, P.D., Healy, S., et al. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. (2010) *Gut* 59(12): 1635-1642.
30. Kovacs, P., Stumvoll, M. Fatty acids and insulin resistance in muscle and liver. (2005) *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19(4): 625-635.
31. Bugianesi, E., McCullough, A.J., Marchesini, G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. (2005) *Hepatology* 42(5): 987-1000.
32. Wei, Y., Chen, K., Whaley-Connell, A.T., et al. Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. (2008) *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294(3): 673-680.
33. Esteve, E., Ricart, W., Fernandez-Real, J.M. Gut microbiota interactions with obesity, insulin resistance and type 2 diabetes: did gut microbiota co-evolve with insulin resistance? (2011) *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14(5): 483-490.
34. Piomelli, D. The molecular logic of endocannabinoid signaling. (2003) *Nat Rev Neurosci* 4(11): 873-884.
35. Engeli, S., Bohnke, J., Feldpausch, M., et al. Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. (2005) *Diabetes* 54(10): 2838-2843.
36. Liu, Y.L., Connoley, I.P., Wilson, C.A., et al. Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in Lep(ob)/Lep(ob) mice. *Int J Obes (Lond)* 29(2): 183-187.
37. Osei-Hyiaman, D., DePetrillo, M., Pacher, P., et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. (2005) *J Clin Invest* 115(5): 1298-1305.
38. Pertwee, R.G. Cannabinoids and the gastrointestinal tract. (2001) *Gut* 48(6): 859-867.
39. Freund, T.F., Katona, I., Piomelli, D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. (2003) *Physiol Rev* 83(3): 1017-1066.
40. Alger, B.E. Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. (2002) *Prog Neurobiol* 68(4): 247-286.
41. Wilson, R.I., Nicoll, R.A. Endocannabinoid signaling in the brain. (2002) *Science* 296(5568): 678-682.
42. Cota, D., Marsicano, G., Tschöp, M., et al. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. (2003) *J Clin Invest* 112(3): 423-431.
43. Browning, J.D., Horton, J.D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. (2004) *J Clin Invest* 114(2): 147-152.
44. Pagotto, U., Marsicano, G., Cota, D., et al. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev* 27(1): 73-100.
45. Bluher, M., Engeli, S., Klötting, N., et al. Dysregulation of the peripheral and adipose tissue endocannabinoid system in human abdominal obesity. (2006) *Diabetes* 55(11): 3053-3060.
46. Matias, I., Gonthier, M.P., Orlando, P., et al. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. (2006) *J Clin Endocrinol Metab* 91(8): 3171-3180.
47. Cote, M., Matias, I., Lemieux, I., et al. Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. (2007) *Int J Obes (Lond)* 31(4): 692-699.
48. Hoareau, L., Buyse, M., Festy, F., et al. Anti-inflammatory effect of palmitoylethanolamide on human adipocytes. (2009) *Obesity (Silver Spring)* 17(3): 431-438.
49. Maccarrone, M., De Petrocellis, L., Bari, M., et al. Lipopolysaccharide downregulates fatty acid amide hydrolase expression and increases anandamide levels in human peripheral lymphocytes. (2001) *Arch Biochem Biophys* 393(2): 321-328.
50. Liu, J., Batkai, S., Pacher, P., et al. Lipopolysaccharide induces anandamide synthesis in macrophages via CD14/MAPK/phosphoinositide 3-kinase/NF-kappaB independently of platelet-activating factor. (2003) *J Biol Chem* 278(45): 45034-45039.
51. Muccioli, G.G., Naslain, D., Backhed, F., et al. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. (2010) *Mol Syst Biol* 6: 392.
52. Cani, P.D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. (2009) *Gut* 58(8): 1091-1103.
53. Cani, P.D., Bibiloni, R., Knauf, C., et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. (2008) *Diabetes* 57(6): 1470-1481.
54. Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Fava, F., et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. (2007) *Diabetologia* 50(11): 2374-2383.
55. Kimura, H., Sawada, N., Tobioka, H., et al. Bacterial lipopolysaccharide reduced intestinal barrier function and altered localization of 7H6 antigen in IEC-6 rat intestinal crypt cells. (1997) *J Cell Physiol* 171(3): 284-290.
56. Sheth, P., Delos Santos, N., Seth, A., et al. Lipopolysaccharide disrupts tight junctions in cholangiocyte monolayers by a c-Src-, TLR4-, and LBP-dependent mechanism. (2007) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293(1): 308-318.
57. Lambert, D.M., Muccioli, G.G. Endocannabinoids and related N-acyl ethanolamines in the control of appetite and energy metabolism: emergence of new molecular players. (2007) *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10(6): 735-744.
58. Engeli, S. Central and peripheral cannabinoid receptors as therapeutic targets in the control of food intake and body weight. (2012) *Handb Exp Pharmacol* (209): 357-381.
59. Van Gaal, L.F., Rissanen, A.M., Scheen, A.J., et al. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. (2005) *Lancet* 365(9468): 1389-1397.
60. Hind, W.H., Tufarelli, C., Neophytou, M., et al. Endocannabinoids modulate human blood-brain barrier permeability in vitro. (2015) *Br J Pharmacol* 172(12): 3015-3027.
61. Brun, P., Castagliuolo, I., Di, L., et al. Increased intestinal

## APÊNDICE B – Obesity and gut microbiota – what do we know so far? (Artigo publicado)



REVIEW

### Obesity and gut microbiota - what do we know so far?

Vicente Lopes da Silva-Junior<sup>1</sup>, Fernanda de Azevedo Marques Lopes<sup>1</sup>, Rodolpho Mattos Albano<sup>1</sup>, Maria das Graças Coelho de Souza<sup>1</sup>, Carolina Monteiro de Lemos Barbosa<sup>1</sup>, Priscila Alves Maranhão<sup>1</sup>, Eliete Bouskela<sup>1</sup>, Luiz Guilherme Kraemer-Aguiar<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Graduate Program in Clinical and Experimental Physiopathology (FISCLINEX), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Departamento de Bioquímica, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>4</sup> Universidade do Porto, Faculdade de Medicina, Departamento de Ciências da Informação e da Decisão em Saúde, Porto, Portugal.

<sup>5</sup> Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Medicina Interna, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

In the history of medicine, only recently has obesity been recognized as a disease. We know now that it is a pandemic condition, partly explained by the so-called Western lifestyle and related to multiple other comorbidities in various systems. This lifestyle includes eating large portions, rich in saturated fats and refined sugar, all coupled with sedentary habits. In recent years, the gut microbiota has been indited as a new culprit in pathophysiological aspects involved in obesity. From studies with animals free of bacteria in the digestive tract, known as “germ-free animals”, the relevance of intestinal microbiota in the regulation of body fat became evident and its importance has also been extended to the pathophysiology of diseases such as diabetes mellitus and coronary heart disease. Characterization of Toll-like receptors led to the discovery of mechanisms that link the immune system with some metabolic pathways and opened new avenues of a previously unknown world to biological sciences. Increased knowledge about interactions between gut microbiota and the host can certainly reveal, in a not too distant future, new therapeutic perspectives for obesity and its related diseases.

**KEYWORDS:** obesity; gut; microbiota

Silva-Junior VL, Lopes FAM, Albano RM, Souza MGC, Barbosa CML, Maranhão PA, Bouskela E, Kraemer-Aguiar LG. Obesity and gut microbiota - what do we know so far? MedicalExpress (São Paulo, online). 2017;4(4):M170401.

Received for Publication on June 24, 2017; First review on July 13, 2017; Accepted for publication on July 22, 2017; Online on August 4, 2017

E-mail: lgkraemeraguiar@gmail.com

#### ■ INTRODUCTION

Obesity is a condition known for millennia in humans, but only recently it started to be considered as a disease.<sup>1</sup> It is estimated that genetic factors may account for 25% to 40% of body mass index (BMI) variance, by determining factors such as differences in basal rate of metabolism and response to overfeeding. It is believed that changes in eating habits and sedentary lifestyle acting on susceptibility genes are the main determinants in the growth of obesity worldwide.<sup>2,3</sup>

The theory of “economic genotype” was introduced by Neel et al. in 1962,<sup>4</sup> according to which individuals with greater ability to accumulate energy during periods of food scarcity would be more likely to survive in such conditions. This concept reinforces the theory of Darwin’s natural selection, according to which

the fittest individuals are selected by nature to maintain their offsprings.

According to recommendations of the World Health Organization<sup>5</sup> for health maintenance, at least 150 minutes of moderate intensity physical activity or 75 minutes of high intensity activity per week must be performed in populations aged 18 to 64 years; however, anthropological studies have shown<sup>1</sup> that isolated African tribes in regions of Kenya and Ethiopia, who keep living habits to very similar those of their ancestors maintain their BMI ranging from 17.8 to 19.1 kg/m<sup>2</sup> due to an estimated 8 hours of daily physical activity; this is up to 16 times more than the above mentioned recommendation.

Such observations have led to a search for genes that may be related to weight gain. Thus, the so-called genetic map of human obesity is in constant process of evolution as new genes and chromosomal regions associated with obesity are identified. In its latest version, this map reports more than 430 genes, markers

DOI: 10.5935/MedicalExpress.2017.04.01

Copyright © 2016 MEDICALEXPRESS. This is an open access article distributed under the terms of the creative commons attribution Non-Commercial License ([creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/](http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)) which permits unrestricted non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

and chromosomal regions associated with human obesity phenotypes.<sup>6</sup>

From the observation of *Drosophila*, in which the same tissue is responsible for providing energy and defense against invading microorganisms, emerged the hypothesis of a "memory" ancestor that connects the immune system and the development of obesity.<sup>1</sup> Actually, we already know that the adipose tissue is capable of producing many substances previously associated solely with the immune system. A family of membrane proteins called Toll-like receptors (TLR) may be the link between the immune system and body metabolism. These receptors are capable of recognizing pathogens, of initiating the immune response and to respond to both lipopolysaccharide (LPS) present in *Gram*-negative bacterial cell walls and to some types of fatty acids.<sup>7</sup>

Accumulation of excessive adipose tissue is due to hyperplasia and hypertrophy and the latter is more susceptible to lipolysis, which broadens the pool of circulating fatty acids to bind to the subtype 4 of TLR (TLR-4); this triggers an immune response that results in a low-grade inflammatory state even in the absence of any infection. This low-grade or subclinical inflammation is often asymptomatic and closely related to insulin resistance. One of the clearest evidences of the importance of TLR-4 in obesity and diabetes has been demonstrated by experiments with TLR-4 knockout mice, which have been shown to be protected from developing diabetes or obesity-related morbidities when exposed to a high-fat diet.<sup>1,8</sup>

The human gastrointestinal microbiota has been physiologically recognized as a true organ that produces local and systemic mediators, which may contribute or cause damage to host metabolism. Among the main signaling molecules, LPS is present in the outer membrane of *Gram*-negative bacteria; in addition to being involved in pyrogenic mechanisms in sepsis, LPS was recently related to low level systemic inflammation present in obesity and metabolic diseases.

This review article aims to discuss the main links between obesity and gut microbiota and how they can change the perspectives of treatment of this disease that has a huge impact on Western civilization.

## ■ MATERIALS, METHODS AND RESULTS

A search was conducted in Pub Med using the terms [gut microbiota] and [obesity] on 06/08/2017, producing 1691 hits. We included 110 articles, after evaluating the clinical relevance of each article as well as the availability of access to the article in its entirety.

## ■ DISCUSSION

### Gut microbiota

Until birth, the gastrointestinal tract of a normal fetus is sterile. During labor and shortly after delivery, bacteria from the mother and surrounding environment colonize the gut of the newborn. The type of delivery seems to influence decisively in this colonization: the gastrointestinal tract of normally delivered babies appears to be colonized predominantly by the mother's gut microorganisms that seem to influence its microbiota up to about one month after birth; in contrast, the gastrointestinal tract from babies delivered by cesarean section appears to be preferentially colonized by bacteria of the surrounding environment, the air; other children and medical staff, and may have its composition changed until the sixth postnatal month. By the second year, the intestinal flora is similar to that found in adults.<sup>9</sup>

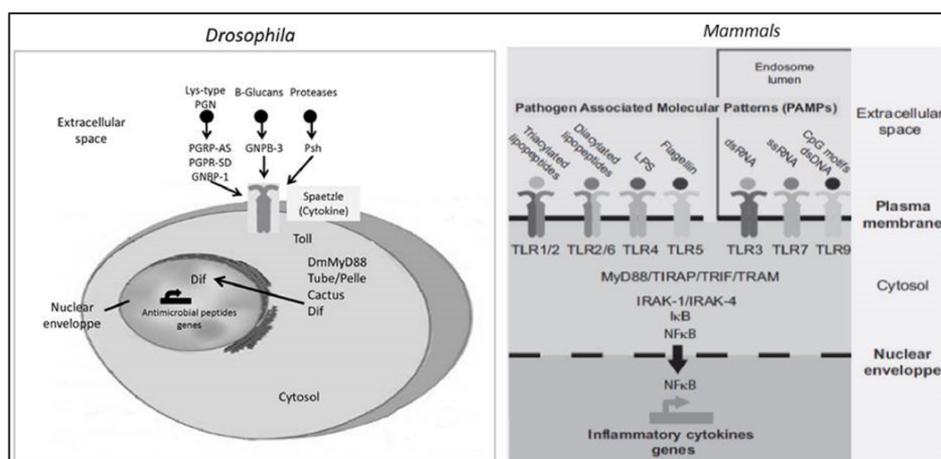
The gastrointestinal tract is initially colonized by aerobic bacteria, including facultative aerobic bacteria. Their expansion consumes oxygen and creates a favorable environment for the growth of strictly anaerobic organisms, most of them belonging to the genera *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium* and *Ruminococcus*.<sup>10</sup>

The pioneer microorganisms may act to induce or modulate the expression of genes in epithelial cells of the host, which may create a favorable environment while preventing the growth of bacteria introduced later in this ecosystem. Thus, the initial colonization is of fundamental importance in establishing the permanent flora of adults.<sup>11,12</sup>

Colonization in the gastrointestinal tract diverges according to its segments. Among the microorganisms, bacteria are the majority with over 90% of the species belonging the phyla Firmicutes and Bacteroidetes.<sup>8</sup> The colonization of gastrointestinal tract has an impact in energy use of non-digestible food such as cellulose and in the synthesis of short chain fatty acids, such as propionic acid that serves as substrate for gluconeogenesis and acetate, a substrate for *de novo* lipogenesis in hepatocytes and adipocytes. Furthermore, the gastrointestinal tract microbiota acts as a barrier against colonization of pathogens and stimulates the development of the immune system.<sup>13,14</sup> Therefore, the intimate contact between commensal bacteria and the intestinal epithelium seems to play a key role in regulating host-commensal bacteria against pathogens (Figure 1).<sup>8</sup>

### Obesity and gut microbiota

The intestinal microbiota of obese subjects is characterized by a higher Firmicutes/Bacteroidetes ratio when compared to lean individuals. Weight loss programs



**Figure 1** - Schematic representation of Toll/TLR pathways in *Drosophila* and mammals. Toll and TLRs activate an evolutionarily conserved signaling pathway. In *Drosophila*, Toll is activated by Spaetzle cytokine, through a proteolytic cascade. In mammals, TLRs are activated on direct binding of microbial molecular patterns. PGN indicates peptidoglycan; dsRNA, double-stranded RNA; ssRNA, single-stranded RNA; Dif, Dorsal-related immunity factor (Adapted from Ley et al.<sup>15</sup>).

are associated with changes in the proportion of both phyla related to how much weight was lost and not with lower calorie intake.<sup>15</sup>

Animals with sterile intestines (e.g., germ-free mice) are protected from diet-induced obesity and its associated comorbidities, whereas when colonized by the intestinal microbiota of other mice, they show significant weight gain 2 weeks after colonization. Interestingly, the weight gain of these colonized animals varies from 40% when the microbiota came from lean mice, to 60% when it came from genetically obese mice (ob/ob mice). Germ-free animals have reduced ability to extract dietary energy associated with reduced energy supply in the liver and skeletal muscle.<sup>16,17</sup> These findings link the germ-free condition to caloric restriction regimen in which there is resistance to develop obesity. Furthermore, caloric restriction is associated with longevity due to improvements in general health.<sup>17,18</sup> However, this resistance to become obese induced by feeding seems to be dependent on specific interactions between diet and microflora.<sup>18</sup>

The greater ability to obtain energy from nutrients observed in the ob/ob mouse appears to be related to genes that encode enzymes that process indigestible polysaccharides, causing an increase in the production of fermentation products, mainly short chain fatty acids. Some authors observed that the amount of calories in the feces of these animals was smaller than what is found in lean animals<sup>19</sup> while others found no differences in the amount of fecal energy of germ-free mice compared to controls.<sup>17</sup> These observations suggest that other mechanisms underlying food energy extraction capacity

could be responsible for weight gain related to intestinal microbiota composition. It has also been reported that intestinal colonization of germ-free animals resulted in significant changes in hormone levels with increased plasma levels of insulin, leptin and glucose, in capillary density and, especially, in the expression of genes that regulate lipogenesis and "energy sensing".<sup>16</sup> An example of such changes is that germ-free animals, when colonized, had reduced expression of the fasting-induced adipocyte factor (FIAF) in the gut epithelium, which is capable of inhibiting the activity of lipoprotein lipase, thus reducing the release of fatty acids from triglycerides.<sup>16,20</sup> Furthermore, higher expression of FIAF stimulates 1 $\alpha$  coactivator peroxisome proliferator-activated receptor; which causes up-regulation of genes encoding regulators of mitochondrial fatty acid oxidation.<sup>17</sup> In contrast, lower levels of FIAF lead to higher lipoprotein lipase activity, causing an increase in storage of triglycerides in the adipocytes.

Another feature that makes germ-free animals more resistant to western diet-induced obesity appears to be related to higher expression of phosphorylated AMP-activated protein kinase (AMPK) in skeletal muscle and liver;<sup>17</sup> since AMPK upregulates fatty acid oxidation and glucose uptake in muscle tissue and inhibits the synthesis of fatty acids and hepatic gluconeogenesis. In adipose tissue, AMPK inhibits fatty acid synthesis and lipolysis; it also inhibits insulin secretion mediated by fatty acids, playing an important role in body weight maintenance and reduction of lipotoxicity.<sup>21</sup> In summary, the protection from diet-induced obesity in germ-free animals occurs through two complementary mechanisms. Even though high levels

of fasting-induced adipocyte factor and increased AMPK activity work independently, they result in reduced storage of triglycerides.

Taken together, the results of the study conducted with germ-free animals directs attention to the active role of the microbiota in oxidation and storage of nutrients and not only to an increased absorption of nutrients by the gut. Contrary to what was believed, germ-free animals fed with a high-fat diet did not become fat and, according to the study, it is likely that dietary fat alone is not enough to cause obesity.<sup>17</sup>

Data from clinical studies (table 1) that investigated changes in the composition of the intestinal microbiota in obesity have been, in general, in agreement with animal models; although these clinical studies are more heterogeneous, this could be attributed to the increased complexity of human lifestyles when compared to experimental animals.

#### Lipopolysaccharide – clinical features

Lipopolysaccharide glycolipids are large molecules formed by covalent bonds between lipid fractions and polysaccharides. They are found in the outer membrane of Gram-negative bacteria; they are also known as endotoxins due to their ability to trigger intense immune responses. The basic structure consists of lipid A associated with an antigenic group O which is probably the molecule responsible for triggering the inflammatory response and low-grade metabolic disorders.<sup>7</sup>

High fat diets appear to favor the uptake of lipopolysaccharides by the intestinal epithelium, but the exact mechanism remains under discussion.<sup>29,30</sup> It has been shown that chylomicron formation promotes absorption of LPS in human colorectal carcinoma model *in vitro*. Chylomicron formation is associated with secretion of LPS by the cells.<sup>31</sup>

Other reports,<sup>32,33</sup> however, showed that an increase of about 10 times in the concentration of fatty acids can harm the integrity of the intestinal mucosal barrier. In animals, the endotoxemia that follows high-fat diet has been associated with reduced expression of genes that encode two proteins, namely zonula occludens-1 and occludin, both important in keeping the selective permeability of the intestinal mucosa.<sup>34</sup>

An alternative route for LPS absorption has been described;<sup>35,36</sup> internalization through intestinal microvilli via a TLR4 dependent mechanism of protein and myeloid differentiation protein type 2; once inside enterocytes, LPS can be transported to the Golgi site of synthesis of chylomicrons.

Upon reaching the bloodstream, LPS is transported by a specific acute phase protein, the LPS binding protein and by lipoproteins into hepatocytes where it is cleared by excretion in bile.<sup>37,38</sup> All classes of plasma lipoproteins can sequester LPS and it seems to be dependent on the amount of phospholipids on their surface.<sup>39</sup>

Under normal conditions, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol is the main acceptor of LPS. However;

**Table 1 -** Main studies evaluating changes in intestinal microbiota composition in humans

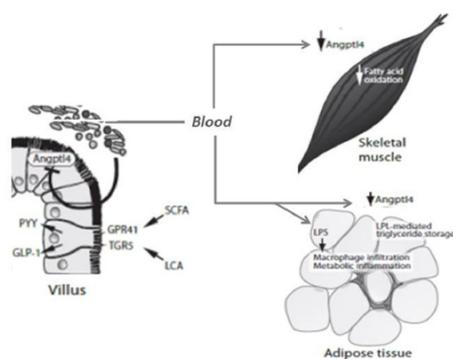
Reference	Population	Brief Methodology	Brief Outcomes
Ley et al. <sup>15</sup>	Obese adults	Diets with fat or carbohydrate restriction. Monitoring of microbiota for 1 year (sequencing of the 16S rRNA gene)	As weight loss was increased, there was absolute reduction in Firmicutes and increase in Bacteroidetes, regardless of the type of diet.
Nadal et al. <sup>24</sup>	Obese and overweight adolescents	Longitudinal study intervention (diet and increased caloric expenditure) for 10 weeks	Reduction in the species <i>C. histoliticum</i> , <i>C. coccoides</i> and <i>E. rectale</i> in those who lost weight.
Santacruz et al. <sup>25</sup>	Overweight adolescents	Longitudinal study intervention (diet and increased caloric expenditure) for 10 weeks	In the group with the highest weight loss, there was an increase of <i>B. fragilis</i> and Lactobacillus and reduction <i>B. longum</i> and <i>C. coccoides</i>
Duncan et al. <sup>26</sup>	Obese adults	Individuals submitted or not to the weight loss program for 4 weeks Longitudinal study intervention (diet) for 4 weeks	Significant reduction of Firmicutes in the feces of those who underwent weight loss
Turnbaugh et al. <sup>27</sup>	Identical twin adult women or not corresponding to obesity or eutrophic mothers Adult female monozygotic and dizygotic twin pairs concordant for leanness or obesity	Sequencing of the 16S rRNA gene to characterize the microbiome.	Microbiome is shared among family members, with some variation between twins, but maintained a "core microbiome". Obesity was associated with changes in phyla and lower bacterial diversity.
Kasai et al. <sup>28</sup>	Japanese population, obese and non-obese	Stool samples. T-RFLP polymorphism	Reduced Bacteroidetes and higher Firmicutes to Bacteroidetes ratio in obese subjects.

in conditions of acute inflammation and infection, plasma HDL is reduced, while triglycerides and chylomicrons are increased. Thus, in this scenario, the LPS binding protein seems to transfer LPS preferentially to low-density lipoprotein (LDL cholesterol) and promote the formation of complexes of LPS with HDL and LDL.<sup>40,41</sup> By increasing and redistributing phospholipids between different lipoproteins, the immuno-stimulatory effect of LPS can be attenuated. This mechanism may represent part of the innate defense system against endotoxemia caused by gram-negative bacteria.<sup>42</sup>

At least three mechanisms have been proposed by which dietary lipid could promote greater absorption of LPS: (a) compositional changes in the intestinal microbiota, (b) increased availability of chylomicrons and (c) changes in the permeability of the intestinal epithelium. Therefore, a diet rich in lipids may contribute to greater absorption of LPS, a fundamental molecule for the process of chronic subclinical inflammation associated with many obesity-related diseases, especially atherosclerosis.

#### Endotoxemia and its importance in cellular metabolism

A new hypothesis, illustrated in Figure 2, has linked intestinal microbiota and metabolic homeostasis.<sup>47</sup> Based on evidence that obesity and type 2 diabetes are both associated with systemic low-grade inflammation<sup>48-51</sup> in the liver, adipose tissue and hypothalamus, Cani *et al.*<sup>29</sup> suggested that bacterial LPS derived from gut bacteria could trigger inflammation that would lead to diabetes induced by high fat diet and obesity.



**Figure 2** - Interaction between intestinal microbiota and host metabolism. LPS derived from the gut can increase inflammation in adipose tissue and reduce insulin sensitivity. Intestinal microbiota affects host's metabolism and secretion of intestinal peptides. Microbiota suppression of ANGPTL4 (angiopoietin-like protein 4) in the intestine increases triglyceride stock mediated by lipoprotein lipase (LPL) in adipose tissue and reduces fatty acid oxidation in skeletal muscle by an yet unidentified mechanism (Adapted from Wellen *et al.*<sup>49</sup>).

In the same study, Cani *et al.* examined the relationship of a diet rich in lipids and circulating LPS and noted that, after the ingestion of fat, LPS levels were approximately 1.4 times higher than observed in animals receiving standard diet, demonstrating a direct relationship between absorption of fat and endotoxin.<sup>29</sup>

The same authors endeavored to demonstrate an *in vivo* relationship of cause and effect between systemic exposure to slightly increased levels of endotoxin and development of weight gain, insulin resistance and low-grade inflammation, which some authors call "metabolic endotoxemia". It seems that endotoxemia exacerbates and accelerates the pro-inflammatory, pro-diabetogenic stage promoted by fatty acids that, in turn, modulate activation of TLR4 by LPS.<sup>52</sup>

Another effect of LPS on adipose tissue is its influence upon adipocyte size, because chronic infusions of LPS were associated with reductions in the average size of adipocytes. The balance between hypertrophy and hyperplasia could influence individual risk of fat mass gain and development of insulin resistance and cardiovascular diseases.<sup>29,53</sup>

Another interesting fact is that the amount of LPS administered in the study performed by Cani *et al.*<sup>29</sup> would be enough to cause anorexia, which was not observed. Chronic exposure to endotoxin probably causes tolerance despite the already known anorexigenic mechanism of LPS. The reasons behind this observation are not completely understood but may be related to genotypic differences between species, hormonal factors such as leptin and ghrelin or biochemical characteristics of LPS.<sup>29</sup>

#### LPS influences insulin signaling

The induction of the inflammatory response by LPS can establish an intersection with insulin signaling at various stages, and may even inhibit it. Insulin acts on target cells through binding to cell surface receptors inducing receptor autophosphorylation and activation of tyrosine kinase receptor activity that phosphorylates various substrates, such as members of insulin receptor family substrates (IRS), triggering its well known effects at the end of the cascade.<sup>54</sup>

It is also now well documented that phosphorylation of serine residues by the insulin receptor reduces ability of IRS-1 to associate with the receptor and thus inhibits the remainder of the cell signaling cascade. TNF $\alpha$  and IL-6 are responsible for the inhibitory phosphorylation of IRS-1.<sup>55</sup>

The key point in the integration of metabolic and immune pathways occurs at the level of the c-Jun N-terminal kinase. Inflammatory signals lead to hyperactivation of the c-Jun N-terminal kinase, resulting in serine phosphorylation of IRS-1.<sup>56,57</sup> However, other points of overlap between immune and metabolic pathways occur at the levels of protein kinase C, the family of suppressors of cytokines such as SOCS-1, 3 and 6 and the induced nitric oxide synthase.<sup>57-61</sup>

At the adipose tissue level, two other mechanisms also contribute to insulin resistance induced by LPS. First, activation of TLR4 in LPS-induced preadipocytes alters the expression of several cytokines, including TNF $\alpha$  and IL-6 by a paracrine route that inhibits insulin signaling in adipocytes.<sup>55</sup> Moreover, LPS promotes the expression of NF- $\kappa$ B and activation of the MAP kinase pathway in adipocytes, leading to target gene expression, such as glucose transporter stimulated by insulin-4 (GLUT-4), adiponectin, fatty acid synthase and perilipin. In adipocytes belonging to the 3T3-L1 cell line; LPS also promotes the expression of inducible nitric oxide synthase.<sup>62,63</sup>

It was observed that low doses of LPS induce a biphasic response in glucose uptake in non-obese individuals. In the early hours, there was an increase in insulin sensitivity, with subsequent reduction.<sup>64,65</sup> This biphasic effect on insulin sensitivity during experimental endotoxemia and sepsis may be due to expression of inducible nitric oxide synthase.<sup>66</sup> LPS increases the uptake of glucose by myocytes through inducible nitric oxide synthase induction. On the other hand, excessive production of nitric oxide (NO) causes a reduction in glucose uptake by muscle cells.<sup>67,68</sup> The effect of NO on insulin action may be perturbed by release of TNF $\alpha$  and IL-6 induced by LPS. Furthermore, excessive production of NO may worsen insulin resistance by increasing the levels of circulating fatty acids, due to loss in lipoprotein lipase activity, which favors lipolysis.<sup>66</sup>

The behavior of blood glucose during sepsis demonstrates this biphasic effect, as shown by the evolution of hypoglycemia to hyperglycemia.<sup>64</sup> LPS-induced hypoglycemia is associated with a reduction in glucose synthesis. In addition, increased activity of NF- $\kappa$ B results in an increase in the expression of inducible nitric oxide synthase and reduced expression of genes that encode limiting enzymes for glucose synthesis such as glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase.<sup>69-71</sup>

Down-regulation of adiponectin receptor expression on surface of monocytes probably also contributes to the reduction in insulin sensitivity. The release of counter-regulatory hormones such as cortisol and growth hormone following the administration of low doses of LPS can contribute to reduction of peripheral and hepatic glucose uptake.<sup>65,72</sup>

#### Type 2 diabetes, hyperinsulinemia and endotoxemia

LPS stimulates insulin secretion and, reciprocally, chronic hyperinsulinemia causes reduction of LPS clearance by reducing the function of hepatic Kupffer cells.<sup>58,73</sup> However, this mechanism that, in theory, would protect against microorganisms of gastrointestinal tract reaching the blood stream, may become exaggerated in the presence of adiposity, hyperinsulinemia, high fat diet, and smoking.<sup>30,74,75</sup> As result, LPS concentration in

plasma increases by about 50% after high-fat diet or when associated with smoking.<sup>30</sup>

Hyperinsulinemia with hyperglycemia may be intensified by endotoxemia, since they reduce jejunal motility and intestinal transit and may facilitate bacterial overgrowth and loss of mucosal integrity, which occurs quite frequently in patients with type 2 diabetes mellitus. Since hyperglycemia and hyperinsulinemia are usually accompanied by a diet rich in lipids and dyslipidemia, they can act as synergistic factors.<sup>76-78</sup> It has been reported that individuals with type 2 diabetes have serum levels of LPS that are 76% higher than those found in healthy individuals.<sup>79</sup>

#### Endotoxemia links dyslipidemia and cardiovascular disease

To our knowledge, the first study to demonstrate the relationship between LPS and cardiovascular risk was published in 1999 by Wiedermann *et al.*<sup>82</sup> showing that individuals with LPS levels above 50 pg/ml had a threefold higher risk of developing atherosclerosis than control subjects.

The positive association between increased levels of LPS and metabolic syndrome suggests a possible clinical utility of endotoxin in serum as a marker of low-grade inflammation and increased cardiovascular risk. This might add power to the classic markers of cardiovascular risk, by providing information about damage to tissues such as the liver endothelium. Through its connection to TLR4 in endothelial cells, monocytes and macrophages, LPS causes the release of pro-inflammatory cytokines, leading to severe endothelial dysfunction, atherosclerotic plaque formation, oxidation of LDL and thrombogenesis.<sup>83</sup> TLRs are not expressed in a constitutive manner in the endothelium, but their expression depends on mechanical and non-mechanical stimuli, which include blood flow disorders,<sup>84</sup> oxidized LDL,<sup>85</sup> endogenous nonlipid ligands,<sup>86</sup> free fatty acids,<sup>87,88</sup> stress factors (heat shock proteins),<sup>87-89</sup> advanced glycosylation end products,<sup>89</sup> as well as fibrinogen, heparan sulfate and hyaluronic acid.<sup>90</sup>

By interacting with the endothelial surface of TLR4, LPS promotes direct endothelial damage by generation of reactive oxygen species.<sup>91</sup> Furthermore, when stimulated by LPS, endothelial cells release pro-inflammatory factors, chemotactic and cell adhesion molecules, which cause transmigration of monocytes,<sup>92,93</sup> differentiation into macrophages and atherosclerotic plaque formation. Among these cytokines, IL-8 is chemotactic for T lymphocytes, directed to the fibrous cap of atherosclerotic plaque;<sup>94,95</sup> very low concentrations of endotoxin (<1ng / ml) can promote this process.<sup>92,93</sup> An interesting aspect is the reduction of cardiovascular risk by statins due to their ability to reduce the effects of endotoxin both on endothelium and macrophages.<sup>96</sup>

### Immunity in obesity triggered by TLR

LPS, when not fully eliminated by hepatocytes, binds to TLR4 present on surface of Kupffer cells, preadipocytes and adipocytes, causing upregulation of CD14<sup>97</sup> and expression of TLR2.<sup>79</sup> Preadipocytes, adipocytes and macrophages present in visceral adipose tissue appear to respond synergistically to inflammatory stimuli. Considerable potential has been assigned to pro-inflammatory visceral adipose tissue, when compared to non-visceral adipose tissue, because it is more readily mobilized during stress.<sup>98,99</sup> Due to its features, visceral adipose tissue seems to be decisive in determining the inflammatory response triggered by TLR activation.

The change in the content of protein CD36 which, in turn, regulates the uptake of plasma free fatty acids in adipose tissue, in muscle, and probably in the liver, might show an association between ectopic fat distribution and metabolic obesity-related disease.<sup>100,101</sup>

### LPS and adipose tissue

Adipose tissue is composed of about 50-70% adipocytes, 20-40% of vascular stroma components, which include pre-adipocytes, fibroblasts, and mesenchymal stem cells, and 1-30% of infiltrating macrophages.<sup>102</sup> Endotoxin in nanograms per milliliter levels induce the release of proinflammatory molecules of macrophages and pre-adipocytes, which in turn trigger insulin resistance in mature adipocytes.<sup>103,104</sup> The trigger for the development of insulin resistance occurs in adipocytes via activation of NF- $\kappa$ B and MAP Kinase signaling, reducing the activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and sensitivity to insulin. Moreover, LPS inhibits adiponectin expression in preadipocytes, whereas addition of LPS to cultures containing adipocytes alone did not adversely affect insulin mediated glucose uptake or adiponectin gene expression.<sup>63</sup>

Under normal conditions, adipocytes regulate lipid metabolic homeostasis, whereas macrophages are responsible for the inflammatory response. However, under special conditions, such as obesity and overeating, pre-adipocytes act as immune cells, displaying phagocytic and anti-microbial activities and differentiating into macrophages.<sup>105,106</sup>

The proinflammatory effect of LPS on preadipocytes can be partially mediated by induction of TLR2 expression.<sup>63</sup> Although TLR4 expression is constitutive in both preadipocytes and adipocytes, expression of TLR2 is induced by either LPS or TNF $\alpha$  and CD14. It seems that the TLR2 receptor is converted into a high molecular weight form, which may be due to recruitment of TLR4, with the formation of a complex. Alternatively, activation of TLR4 can induce the formation of intracellular effectors to form a complex with TLR2.<sup>103</sup>

Evidence supports the concept that fatty acids, more particularly lauric and palmitic acids, can promote insulin resistance and weight gain, being associated with low-grade inflammation through activation of TLR2 and TLR4.<sup>52</sup> TLR4 activation mediated by fatty acids has been demonstrated in some cellular models.<sup>87,107</sup> However, Erridge *et al.* in their study attributed this activation to other molecules in their preparation and not to fatty acids.<sup>108</sup>

Thus, fatty acids appear to induce activation of TLR4 through formation of "lipid rafts" understood as membrane microdomains that help to bring together receptors, co-receptors, adapters and distal cascades of signaling molecules.<sup>52</sup> Although saturated fatty acids have the ability to activate this process, polyunsaturated fatty acids inhibit the dimerization and recruitment of TLR4.<sup>109</sup>

In type 2 diabetes mellitus, a condition in which we have a stimulated lipolysis, increased free fatty acids can promote activation of TLR in various tissues. In fact, it has been shown that high glucose levels and LDL oxidized particles, can strengthen expression and activation of TLR4, supporting the crucial role of fatty acids in the relationship between nutrition and immunity.<sup>110,111</sup>

### Therapeutic prospects in the modulation of intestinal microbiota and microbiota-host mutualism

In animal models of insulin resistance (*ob/ob* mouse and diet-induced obesity), intestinal microbiota composition was modulated by administration of antibiotics. The combination of norfloxacin and ampicillin suppressed the number of aerobic and anaerobic cecal bacteria in mice with insulin resistance. After 2 weeks of antibiotic treatment, there was a significant improvement in fasting plasma glucose and oral glucose tolerance in *ob/ob* mice, independently of food intake or adiposity. A reduction in the amount of liver triglycerides and increased hepatic glycogen in animals treated with antibiotics was also observed. In addition, there was a decrease in LPS plasma levels and an increase in adiponectin levels, supporting the antidiabetic effects of treatment with antibiotics in *ob/ob* mouse.<sup>112</sup>

The use of prebiotics (oligosaccharides and derivatives of inulin, soluble fibers) may be justified by their ability to stimulate growth of beneficial bacteria such as *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* in the intestines, as well as generation of fermentation products and short chain fatty acids with anti-inflammatory action by binding to leukocyte receptors, reducing appetite and inhibiting adhesion and infection of pathogens to intestinal epithelial cells.<sup>113</sup>

Although the use of prebiotics and probiotics has yielded encouraging results in experimental models of liver steatosis, results in human studies of obesity and cardiovascular disease are not consistent.

Recently, Plovier *et al.*<sup>114</sup> observed improved metabolism in obese and diabetic mice treated with

*Akkermansia muciniphila* either as a purified membrane protein or in pasteurized form, with better results when pasteurization was performed.

## ■ CONCLUSION

Gut microbiota has an enormous potential to become one of the most important features in the fight against obesity, type 2 diabetes and cardiovascular disease worldwide. However, much remains to be investigated in this fascinating field of science. As further studies are conducted, important new discoveries will be added to our scant current knowledge, so that in near future, we can have more effective ways to modulate the microbiome with possible beneficial effects on human health.

## ■ AUTHORS CONTRIBUTIONS

VLSJ, FAML (literature review and writing of the manuscript); RMA and EB (revised the manuscript); MGCS, CMLB and PAM (literature review); LGKA (conceived the review, revised the manuscript and edited the final version).

## ■ CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## ■ FUNDING

This study was supported by grants from the National Council for Scientific and Technologic Development (CNPq) and Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support in the State of Rio de Janeiro (FAPERJ).

## REVISÃO: OBESIDADE E MICROBIOTA INTESTINAL - O QUE SABEMOS ATÉ AGORA?

Na história da medicina apenas recentemente a obesidade foi reconhecida como uma doença. Sabemos agora que é uma doença pandêmica, explicada em parte pelo chamado estilo de vida ocidental e relacionado a múltiplas outras comorbidades em vários sistemas. O referido estilo de vida inclui comer grandes porções, ricas em gorduras saturadas e açúcares refinados, e hábitos sedentários.

Nos últimos anos, a microbiota intestinal foi associada aos aspectos fisiopatológicos envolvidos na obesidade. De estudos com animais livres de bactérias no trato digestivo, conhecidos como "animais sem germes", a relevância da microbiota intestinal na regulação da gordura corporal tornou-se evidente e sua importância também se estendeu à fisiopatologia de doenças como diabetes mellitus e doença cardíaca coronária. A caracterização dos

receptores "Toll-like" levou à descoberta de mecanismos que ligam o sistema imunológico a algumas vias metabólicas e abriram novas avenidas de um mundo anteriormente desconhecido para as ciências biológicas.

O aumento do conhecimento sobre as interações entre a microbiota intestinal e o hospedeiro certamente pode revelar, em um futuro não muito distante, novas perspectivas terapêuticas para a obesidade e suas doenças relacionadas.

**PALAVRAS-CHAVE:** obesidade; intestino; Microbiota

## ■ REFERENCES

1. Marco Antônio de Carvalho Filho JRP, Eduardo Rochete Ropelle, Denny Esper Cintra. Obesidade e diabetes: da origem ao caos. In: Obesidade e Diabetes: Fisiopatologia e Sinalização Celular. 1 ed. Denny E. Cintra ERRJRP, editor. São Paulo: SARVIER; 2011 405 p.
2. C. B. The Genetics of Obesity. In: Bouchard C, ed. Genetics of obesity: overview and research direction. Boca Raton; 1994:223-2331994.
3. R. P. Genetics and common obesity: background, current status, strategies, and future prospects. In: Wadden T, Stunkard AJ, eds. Handbook for Obesity Treatment. New York, NY: Guilford Press; 2002:73-94.2002.
4. Neel JV. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet.* 1962;14:353-62.
5. Global Strategy on Diet, Physical activity and Health. World health Organization retrieved from [www.who.int/dietphysicalactivity/factsheet\\_adults/en/index.html](http://www.who.int/dietphysicalactivity/factsheet_adults/en/index.html).
6. Snyder EE, Walts B, Perusse L, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Rankinen T, et al. The human obesity gene map: the 2003 update. *Obes Res.* 2004;12(3):369-439. DOI:10.1038/oby.2004.47.
7. Beutler B, Hoebe K, Du X, Ulevitch RJ. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol.* 2003;74(4):479-85. DOI:10.1189/jlb.0203082.
8. Manco M, Putignani L, Bottazzo GF. Gut microbiota, lipopolysaccharides, and innate immunity in the pathogenesis of obesity and cardiovascular risk. *Endocr Rev.* 2010;31(6):817-44. DOI:10.1210/er.2009-0030.
9. Bettelheim KA, Breardon A, Faiers MC, O'Farrell SM, Shooter RA. Origin of O serotypes of *Escherichia coli* in babies after normal delivery. *J Hyg (Lond).* 1974;72(1):67-70.
10. Adlerberth I, Wold AE. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatr.* 2009;98(2):229-38. DOI:10.1111/j.1651-2227.2008.01060.x.
11. Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science.* 2001;292(5519):1115-8. DOI:10.1126/science.1058709.
12. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet.* 2003;361(9356):512-9. DOI:10.1016/S0140-6736(03)12489-0.
13. Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science.* 2006;312(5778):1355-9. DOI:10.1126/science.1124234.
14. Bergman EN. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev.* 1990;70(2):567-90.
15. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature.* 2006;444(7122):1022-3. DOI:10.1038/nature4441022a.
16. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(44):15718-23. DOI:10.1073/pnas.0407076101.
17. Backhed 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;104(3):979-84. DOI:10.1073/pnas.0605374104.

18. Fleissner CK, Huebel N, Abd El-Bary MM, Loh G, Klaus S, Blaut M. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. *Br J Nutr*. 2010;104(6):919-29. DOI:10.1017/S0007114510001303.
19. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JL. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027-31. DOI:10.1038/nature05444.
20. Yoshida K, Shimizugawa T, Ono M, Furukawa H. Angiopoietin-like protein 4 is a potent hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase. *J Lipid Res*. 2002;43(11):1770-2. DOI:10.1194/jlr.C200010-JLR200.
21. Xue B, Kahn BB. AMPK integrates nutrient and hormonal signals to regulate food intake and energy balance through effects in the hypothalamus and peripheral tissues. *J Physiol*. 2006;574:73-83. DOI:10.1113/jphysiol.2006.113217
22. Cani PD, Joly E, Horsmans Y, Delzenne NM. Oligofructose promotes satiety in healthy human: a pilot study. *Eur J Clin Nutr*. 2006;60(5):567-72. DOI:10.1038/sj.ejcn.1602350.
23. Cani PD, Neyrinck AM, Maton N, Delzenne NM. Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like Peptide-1. *Obes Res*. 2005;13(6):1000-7. DOI:10.1038/oby.2005.117.
24. Nadal I, Santacruz A, Marcos A, Warnberg J, Garagorri JM, Moreno LA, et al. Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. *Int J Obes*. 2009;33(7):758-67. DOI:10.1038/ijo.2008.260.
25. Santacruz A, Marcos A, Warnberg J, Marti A, Martin-Matillas M, Campoy C, et al. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17(10):1906-15. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents.
26. Duncan SH, Lobbey GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes*. 2008;32(11):1720-4. DOI:10.1038/ijo.2008.155.
27. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009;457(7228):480-4. DOI:10.1038/nature07540.
28. Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, Tanaka J, Oya Y, Inoue H, et al. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterol*. 2015;15:100. DOI:10.1186/s12876-015-0330-2.
29. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(7):1761-72. DOI:10.2337/db06-1491.
30. Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr*. 2007;86(5):1286-92.
31. Ghoshal S, Witta J, Zhong J, de Villiers W, Eckhardt E. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J Lipid Res*. 2009;50(1):90-7. DOI:10.1194/jlr.M800156-JLR200.
32. Brun P, Castagliuolo I, Di Leo V, Buda A, Pinzani M, Palu G, et al. Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292(2):G518-25. DOI:10.1152/ajpgi.00024.2006.
33. Velasquez OR, Henninger K, Fowler M, Tso P, Crissinger KD. Oleic acid-induced mucosal injury in developing piglet intestine. *Am J Physiol*. 1993;264(3 Pt 1):G576-82. PubMed PMID: 8460708.
34. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57(6):1470-81. DOI:10.2337/db07-1403.
35. Neal MD, Leaphart C, Levy R, Prince J, Billiar TR, Watkins S, et al. Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier. *J Immunol*. 2006;176(5):3070-9. DOI:10.4049/jimmunol.176.5.3070.
36. Hornef MW, Frisan T, Vandewalle A, Normark S, Richter-Dahlfors A. Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J Exp Med*. 2002;195(5):559-70. DOI:10.1084/jem.20011788.
37. Munford RS, Andersen JM, Dietschy JM. Sites of tissue binding and uptake in vivo of bacterial lipopolysaccharide-high density lipoprotein complexes: studies in the rat and squirrel monkey. *J Clin Invest*. 1981;68(6):1503-13. DOI: 10.1172/JCI110404.
38. Read TE, Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Calhoun MC, Kane JP, et al. Chylomicrons enhance endotoxin excretion in bile. *Infect Immun*. 1993;61(8):3496-502.
39. Levels JH, Abraham PR, van den Ende A, van Deventer SJ. Distribution and kinetics of lipoprotein-bound endotoxin. *Infect Immun*. 2001 May;69(5):2821-8. DOI:10.1128/IAI.69.5.2821-2828.2001.
40. Levels JH, Marquart JA, Abraham PR, van den Ende AE, Molhuizen HO, van Deventer SJ, et al. Lipopolysaccharide is transferred from high-density to low-density lipoproteins by lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein. *Infect Immun*. 2005;73(4):2321-6. DOI:10.1128/IAI.73.4.2321-2326.2005.
41. Kitchens RL, Thompson PA, Munford RS, O'Keefe GE. Acute inflammation and infection maintain circulating phospholipid levels and enhance lipopolysaccharide binding to plasma lipoproteins. *J Lipid Res*. 2003;44(12):2339-48. DOI:10.1194/jlr.M300228-JLR200.
42. Levine DM, Parker TS, Donnelly TM, Walsh A, Rubin AL. In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(24):12040-4. DOI:10.1073/pnas.90.24.12040.
43. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(4):331-41. DOI:10.1038/nri1057.
44. Cario E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut*. 2005;54(8):1182-93. DOI:10.1136/gut.2004.062794.
45. Strobel S, Mowat AM. Oral tolerance and allergic responses to food proteins. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2006;6(3):207-13. DOI:10.1097/01.all.0000225162.98391.81.
46. Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F, Wu H. Oral tolerance. *Immunol Rev*. 2011;241(1):241-59. DOI:10.1111/j.1600-065X.2011.01017.x.
47. Bäckhed F. Programming of host metabolism by the gut microbiota. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2011;58(Suppl2):44-52. DOI:10.1159/000328042
48. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1111-9. DOI: 10.1172/JCI200525102.
49. Caricilli AM, Nascimento PH, Pauli JR, Tsukumo DM, Velloso LA, Carvalheira JB, et al. Inhibition of toll-like receptor 2 expression improves insulin sensitivity and signaling in muscle and white adipose tissue of mice fed a high-fat diet. *J Endocrinol*. 2008;199(3):399-406. DOI:10.1677/JOE-08-0354.
50. Carvalho-Filho MA, Ueno M, Hirabara SM, Seabra AB, Carvalheira JB, de Oliveira MG, et al. S-nitrosation of the insulin receptor: insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes*. 2005;54(4):959-67. DOI:10.2337/diabetes.54.4.959.
51. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(8):1986-98. DOI:10.2337/db06-1595.
52. Lee JY, Zhao L, Hwang DH. Modulation of pattern recognition receptor-mediated inflammation and risk of chronic diseases by dietary fatty acids. *Nutr Rev*. 2010;68(1):38-61. DOI:10.1111/j.1753-4887.2009.00259.x.
53. Virtue S, Vidal-Puig A. It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *PLoS Biol*. 2008;6(9):e237. DOI:10.1371/journal.pbio.0060237.
54. Saltiel AR, Pessin JE. Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol*. 2002;12(2):65-71. DOI:10.1016/S0962-8924(01)02207-3.

**APÊNDICE C** – Correlation between duodenal epithelium and liver damage in obesity and glucose intolerance independently of intestinal microbiota (Artigo Submetido)

**CORRELATION BETWEEN DUODENAL EPITHELIUM AND LIVER DAMAGE IN OBESITY AND GLUCOSE INTOLERANCE INDEPENDENTLY OF INTESTINAL MICROBIOTA**

Fernanda de Azevedo Marques Lopes<sup>1</sup>, Vicente Lopes da Silva Júnior<sup>2</sup>, Ana Teresa Pugas Carvalho<sup>3</sup>, Davy Carlos Mendes Rapozo<sup>4</sup>, Carolina Monteiro de Lemos Barbosa<sup>6</sup>, Carlos Antônio Rodrigues Terra Filho<sup>3</sup>, Maria das Graças Coelho de Souza<sup>6</sup>, Rodolpho Matos Albano<sup>5</sup>, Priscila Alves Maranhão<sup>6</sup>, Eliete Bouskela<sup>6</sup>, Raquel Carvalho Castiglione<sup>6</sup>, Luiz Guilherme Kraemer-Aguiar<sup>6-7\*</sup>.

- 1- Postgraduate Program in Clinical and Experimental Physiopathology (FISCLINEX). State University of Rio de Janeiro (UERJ). Rio de Janeiro, RJ, CEP 20551-030 – Brazil.
- 2- Postgraduate Program in Clinical and Experimental Physiopathology (FISCLINEX). State University of Rio de Janeiro (UERJ). Rio de Janeiro, RJ, CEP 20551-030 – Brazil.
- 3- Gastroenterology Unit, Policlínica Piquet Carneiro, Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 20550-030 – Brazil.
- 4- Research Center, Brazilian National Cancer Institute, Rio de Janeiro, RJ, 20231-050 – Brazil
- 5- Department of Biochemistry, Roberto Alcântara Gomes Biological Institute. State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 20551-030 – Brazil.
- 6- Laboratory for Clinical and Experimental Research on Vascular Biology (BioVasc), Biomedical Center. State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 20551-030 – Brazil.
- 7- Obesity Unit, Policlínica Piquet Carneiro, Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 20550-030 – Brazil.

**Keywords:** Obesity, Intestinal Epithelium, Microbiota, Liver Disease

**Running head:** Intestinal Epithelium and Metabolic Syndrome

**\*Corresponding Author:**

Luiz Guilherme Kraemer-Aguiar

E-mail: [gkraemer@ig.com.br](mailto:gkraemer@ig.com.br)

Tel. 55-21-2334-0703 Fax. 55-21-2334-0692

Endocrinology, Department of Internal Medicine

Medical Sciences Faculty, State University of Rio de Janeiro, 20550-013, Rio de Janeiro

BRAZIL

Counting:

Total: Abstract – 186; Manuscript: 3515; Figure – 5; Tables - 2

**What is already known about this subject?**

- Changes in the fecal microbiota profile occur in obesity.
- Patients with obesity and glucose intolerance appear to present changes in intestinal permeability that promote an inflammatory phenotype.

**What does this study add?**

- We evaluated markers of duodenal epithelial function integrity, hepatic fibrosis and steatosis and fecal microbial profile in individuals with varying degrees of body fat and glucose tolerance. We observed that the altered intestinal barrier is related to insulin resistance and worsening of liver damage, independently of bacterial phyla composition.

## Abstract

**Objective:** In this cross-sectional study, we investigated the association between morphofunctional changes of the intestinal epithelium, fatty liver disease, and intestinal microbiota composition.

**Methods:** Forty-six individuals were included and divided into control (n: 16; BMI:  $25.5 \pm 2.34$ ; glucose: 99 [93-109]), obese (n: 15; BMI:  $34.97 \pm 3.42$ ; glucose: 101 [94.75-104.5]) and obese with diabetes (n: 15; BMI:  $35.22 \pm 2.62$ ; glucose: 118.5 [113.8-155.5]) groups. We analyzed intestinal epithelium by histomorphometry, enzyme expression and activity of structural proteins and levels of LPS (lipopolysaccharide), and also hepatic elastography, serum inflammatory biomarkers and circulating LPS. The composition of the fecal microbiota was analyzed by amplification of the V4 region of the 16S rRNA gene which was sequenced with Illumina technology.

**Results:** LPS was directly related to the degree of body adiposity and inversely related with indexes of duodenal epithelial thickness. We observed lower expression of intestinal  $\beta$ -actin and activation of alkaline phosphatase which were related to a metabolic syndrome phenotype and to markers of liver damage. We did not observe any correlation between these alterations and the Bacteroidetes/Firmicutes ratio in fecal material from the individuals enrolled in this study.

**Conclusion:** We demonstrate that the intestinal epithelium is altered in the inflammatory phenotype present in individuals with metabolic syndrome and that this occurs independently of microbial dysbiosis. New investigations should be conducted to test such associations.

## 1. Introduction

The relationship between gut microbiota composition and changes in the intestinal epithelium and how they influence the inflammatory profile associated with the metabolic syndrome still needs to be confirmed (56, 57). Previous studies reported that lean and obese individuals do not differ only in anthropometry and biochemical parameters, but also in intestinal microbiota (IM) composition (12, 56). The proposed hypotheses that relate the microbiota to obesity describes an increase in energy extraction from food by microorganisms. Furthermore, the influence of the microbiota on gene expression, energy homeostasis and metabolism, the modulation of the brain-intestinal axis, endocannabinoid system and, finally, on the promotion of systemic inflammation and insulin resistance, may be due to changes in intestinal permeability and an increase of circulating endotoxins (22).

Changes in intestinal permeability appear to be present in the obese and dysglycemic phenotypes (79). Gram-negative bacteria are part of the intestinal microbiota and lipopolysaccharide (LPS) is present on their outer membrane. LPS is viewed as a culprit for the dysregulation of the intestinal epithelium, through the potentiation of subclinical inflammation (57) and action on the expression of junctional proteins, culminating with the increase of intestinal permeability (48).

Intestinal alkaline phosphatase (IAP) is a crucial enzyme in intestinal homeostasis because it detoxifies the LPS and prevents the translocation of microorganisms into the bloodstream (80). In animal models, IAP seems to have a role in the selection of bacteria that colonize the colon (89), and by adding this enzyme to the diet a reversion of the metabolic syndrome phenotype occurred, demonstrating the critical role of this enzyme (91).

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is often seen in metabolic syndrome and insulin resistance. Recent data have linked the intestinal microbiota to changes in host metabolism indicating it may play a role in the progression of NAFLD (96). Some mechanisms may explain this relationship. Among them, LPS also appears to play a part by inducing changes on intestinal permeability and activating the inflammatory cascade which consequently promotes the subclinical inflammation present on NAFLD.

In this work, we primarily aimed to evaluate associations among intestinal microbiota composition, morphological changes of the duodenal epithelial and hepatic fibrosis/steatosis in patients with varying degrees of glucose tolerance and body mass. We also compared variables tested between the groups, which were composed of controls, obese and obese with dysglycemia.

## **2. Methods**

### **2.1 Participants**

We recruited subjects with obesity (with or without dysglycemia) and those lean or overweight ones with normal glucose tolerance at a tertiary hospital. We invited them to participate in the study after signing an informed consent form. We diagnosed dysglycemia according to the criteria of the American Diabetes Association (144). Thus, euglycemic subjects were those with fasting plasma glucose (PG) <100 mg/dL or 2-hour PG during the oral glucose tolerance test (OGTT; 75 g glucose anhydrous) <140 mg/dL; while dysglycemic ones were those with FPG ranging from 100-125 mg/dL or 2-hour PG of 140-199 mg/dL. We also used glycated hemoglobin levels (HbA1c; >5.7%) as a criterion for dysglycemia.

Forty-six subjects were selected and divided into three groups: obese with dysglycemia (OBD group), obese with normoglycemia (OB) and lean/overweight with normoglycemia as controls (C). They were between 18 and 50 years-old. Excluding criteria were history of acute or chronic diseases, unstable dietary profile, use of probiotics, antibiotics, oral corticosteroids, cytokines, methotrexate or cytotoxic immunosuppressive agents in the last six months, pregnancy and lactation, smoking, alcohol use and positivity for HIV and hepatitis B and C infections.

### **2.2 Anthropometric and dietary profile**

We measured height (cm), weight (kg) and the waist (cm) and hip circumferences (cm). We assessed body mass (kg) on a digital scale with a precision of 100 g, and stature with a stadiometer, with the precision of 0.1cm (Filizola®). We calculated BMI by dividing weight (kg) by height<sup>2</sup> (m). Flexible tapes with 0.1 cm-long measured waist (WC) and hip (HC) circumferences in duplicate, respectively at, the midpoint between the last costal arch and the iliac crest, during expiration, and at the point of the greatest circumference of the gluteal region. We also calculated waist/hip ratio (WHR). The bioimpedance assessment (Byo dynamics 450 Body Composition Analyzer™, Bio-Dynamic Corporation®, SE, USA) was performed with fasting patients of 8 hours and without practicing physical activity in the 24 hours preceding the exam. Subsequently, we applied the food frequency questionnaire.

### **2.3 Laboratory tests**

We collected fasting blood samples from all participants, and the serum was centrifuged and frozen until analysis. Laboratory tests included HbA1c, lipid profile, liver profile, urea, creatinine, amylase, lipase, and coagulogram. Later, we performed the dosages of biochemical markers, inflammatory and intestinal peptides following a standard meal (Nutridrink®, Danone, Paris, France). At this point, we measured PG, insulin, tumor necrosis

factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), bacterial lipopolysaccharide (LPS), LPS binding-protein (LBP), insulin, interleukin-6 (IL-6), adiponectin, leptin, glucagon-like peptide -1 (GLP-1) and retinol binding-protein 4 (RBP-4). The collection was done after an 8-hour fast in all subjects at baseline, 30 and 60 minutes after a standard meal. On supporting information, we described the methodology employed for all analytes mentioned above. We used homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) to quantify fasting insulin resistance [(PG in mmol/L x insulin in  $\mu$ UI/mL)/22.5] (143).

#### **2.4 Intestinal epithelium analysis**

After a 12-hour fast, the patients underwent a high digestive endoscopy (Fujinon EG-410HR, Fuji Photo Optica, Uetake, Omiya, Japan) by video endoscope for tissue collection. We performed ten biopsies with jumbo calipers at the second portion of the duodenum.

A part of the material was preserved in 10% formalin and embedded into paraffin. The sections were stained with hematoxylin and eosin, and the slides were photographed using an optical microscope coupled to a camera, with an increase of 100x. The images obtained were transferred and processed in a computer and analyzed with Image J software (National Institutes of Health, Redmond, Washington, USA). Histomorphometry analyzed the following parameters: total epithelial thickness, intestinal villus height, villi diameter I, villi diameter II, crypt height and villus-crypt relation (Figure 1).

The other duodenum samples were placed in cryotubes and immediately immersed in liquid nitrogen for further quantification of protein expression and enzymatic analysis.

We analyzed the cellular protein expression of beta-actin, villin-1, myosin-2 light chain, and phosphomyosine by Western-Blot technique. We evaluated the activity of intestinal alkaline phosphatase in the tissue through the Alkaline Phosphatase Assay Kit (ab83369, Abcam, Cambridge, MA, USA). The kit uses p-nitrophenyl phosphate (pNPP) as a phosphatase substrate that turns yellow ( $X_{\max}=405\text{nm}$ ) when dephosphorylated by Alkaline Phosphatase. The immunohistochemical (HI) technique assessed protein expression of villin. The primary antibody used was anti-villin (clone 3E5G11)-N-terminal (Abcam, Cambridge, MA, USA).

#### **2.5 Analysis of hepatic variables**

Transient hepatic elastography (THE; also named FibroScan®; Echosens, Paris, France) measured hepatic rigidity. The degree of hepatic fibrosis was measured in Kilopascals (kPa). For the measurement of steatosis, we used the CAP (Controlled Attenuation Parameter) as a tool. We performed most of the tests with the M probe (standard), where it is possible to

use the CAP. However, according to higher body masses of some individuals, we had to employ an XL probe to achieve a broader range (between 35 and 75 mm of the skin) and, in these cases, we could not obtain the grade of hepatic steatosis. We only considered measures as valid when ten measurements occurred with a success rate higher than 60% (number of valid measurements/total number of measurements).

## **2.6 Fecal microbiota analysis**

The process of collecting, storing and transporting the material was previously and exhaustively explained to all participants, to promote the adequate collection and avoid contamination. During feces processing, we extracted the DNA present in the fecal samples by the MoBio Power Soil DNA Isolation kit (Carlsbad, CA, USA). We used the resulting DNA to amplify the region of 254 base pairs corresponding to the V4 loop of the 16S rRNA with primers F515 and R806 by PCR (145). Sequencing was conducted on an Illumina MiSeq instrument with the 500-cycle MiSeq reagent kit V2 with paired 250 bp reads.

Paired-end sequence reads were demultiplexed with MiSeq software and were processed through quality control and analysis procedures following the MiSeq SOP with mothur software (<http://www.mothur.org>, version 1.37.0) (146). Briefly, paired reads were joined, sequence errors were reduced, sequences were aligned against a reference sequence database, chimeric sequences were removed and the sequences were taxonomically classified. Unique sequences were then clustered into operational taxonomic units (OTUs) with a 97% sequence identity cut-off. All sequence reads have been submitted to the SRA database under accession number SRP151928.

## **2.7 Statistical analysis**

Statistical analyzes were performed by GraphPad Prism® 5 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The Gaussian distribution was checked, and the parametric and non-parametric data were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation and median [1st-3rd quartiles], respectively. To calculate the sample size, we used G\*Power 3.1.9.2 software (Universität Kiel, Germany) which indicated 40 patients as the total sample size. For this, we considered the point-biserial correlation model, two-tail, a coefficient of determination of 0.25 that indicated an effect size of 0.5, a power (1-error  $\beta$  probability) of 0.95 and an  $\alpha$  error probability of 0.05. For the investigation of the primary endpoint of the study, we tested the linear correlations between the variables through the Pearson or Spearman tests, and for the subsequent aim, we used ANOVA or Kruskal-Wallis tests. We used Tukey and Dunns posthoc tests for variables with normal or non-normal distributions, respectively.

To optimize the data obtained in the pre- and post-ingestion periods of the standardized meal, we calculated linear regression equations for each variable tested. These equations model the relationship between the dependent (biomarkers) and independent variables (time) providing slopes and intercepts values, which better define a linear relationship between the dependent variable (biomarker) and collection time points. The slope represents the degree of slope of the regression line and can be characterized as positive, negative or zero. The higher the magnitude of the slope, the higher the rate of change of the dependent variable as a function of time. The intercept represents the point where the regression line crosses the axis of the dependent variable. Mean values of slopes and intercepts were also used in the analysis. The value of  $P < 0.05$  was considered significant.

### 3. Results

#### 3.1 Comparisons between groups

The clinical and biochemical characteristics of the subjects at recruitment are listed in Table 1. Women comprised 82.6% of the subjects which were divided into controls (C), with obesity (OB) and with obesity and diabetes (OBD) and, in this latter group, all subjects were using metformin. Concerning dietary habits and considering energy group, polyunsaturated and monounsaturated fatty acids, there was no statistically significant difference among groups. During the standard meal test, we performed a point-to-point comparison of the variables measured serially before and after meal intake (PG, insulin, LPS and GLP-1). In this analysis, the groups showed differences in following variables: PG at baseline, 30 and 60 minutes and insulin at baseline (Table 2). GLP-1 and LPS were not statistically significant among groups, both in the point-to-point comparison and in the analysis of the intercept and slope.

Histomorphometry of the intestinal epithelium did not show any significant differences among groups. Regarding protein expressions in the intestinal epithelium, we also did not notice differences on villin, myosin, P-myosin, P-myosin/myosin, and  $\beta$ -actin expressions. In contrast, the IAP activity showed a difference among the three groups C, B and OBD (respectively,  $0.75 \pm 0.23$  U/ml vs.  $0.43 \pm 0.31$  vs.  $0.56 \pm 0.27$  U/ml;  $P=0.02$ ) with a relevant distinction between groups C vs. OBD ( $P < 0.05$ ; Figure 2).

Regarding the degree of hepatic rigidity, we observed a difference among groups C, OBD and OB (respectively,  $4.9[3.9-5.2]$ kPa vs.  $6.1[5.5-7.8]$ kPa vs.  $5.35[3.67-9.47]$ kPa,  $P=0.03$ ) with a relevant difference between C vs. OBD ( $P < 0.05$ ). Considering hepatic fat content, we observed differences between groups C, OBD and OB (respectively,  $185[155-$

203]dB/m vs. 228 [202.5-228.5] vs. 218 [181-267.8] dB/m,  $P=0.02$ ), and a relevant one between C vs. OBD ( $P<0.05$ ).

We noticed a marked individual variability in the taxonomic composition of the fecal microbiota in subjects of all groups (not shown). In general, the predominant phyla were Firmicutes and Bacteroidetes, followed by Proteobacteria. We did not observe statistically significant differences on the proportion of either Firmicutes or Bacteroidetes or on the Bacteroidetes/Firmicutes ratio among the groups (Figure 3).

### 3.2 Correlations

We observed that LPS levels were directly related to weight, WC, fat mass and ferritin levels (Figure 4) and LBP associated with waist-hip ratio ( $\rho=0.37$ ,  $P<0.05$ ) and insulin levels at 30 min ( $\rho=-0.29$ ,  $P<0.01$ ).  $\beta$ -actin correlated inversely to BMI, PG and insulin at baseline, HOMA-IR, and  $\gamma$ GT (Figure 5). There was also an association between  $\beta$ -actin and ferritin ( $\rho=-0.33$ ,  $P<0.05$ ). The other investigated proteins did not present associations with clinical significance. We did not observe associations of IAP with any anthropometric data, epithelial proteins or hepatic elastography indexes. However, IAP correlated to some biochemical measures, such as HbA1c ( $\rho=-0.62$ ,  $P<0.01$ ),  $PG_{AUC}$  ( $\rho=-0.48$ ,  $P<0.01$ ) and  $\gamma$ GT ( $\rho=-0.39$ ,  $P<0.05$ ). The total thickness of the intestinal epithelium ( $\rho=-0.39$ ,  $P<0.01$ ) and villus height ( $\rho=-0.32$ ,  $P<0.05$ ) related to LPS at time 60 and the villi/crypt ratio associated negatively with BMI ( $r=-0.44$ ,  $P<0.01$ ).

Regarding hepatic elastography, both hepatic fibrosis and fat content were directly related to markers of adiposity, insulin resistance, and inflammatory biomarkers. Among structural proteins, only  $\beta$ -actin showed a significant and inverse correlation to hepatic fibrosis (Figure 6).

## 4. Discussion

This is a study with a cross-sectional design and although our observations may suggest inferences on cause-effect, further studies specifically designed to investigate this are needed. Concerning data of the duodenal intestinal histomorphometry, LPS presented an inverse correlation to the total thickness and the height of the villus and one possible explanation for this finding would be the thinning of the wall of the intestinal epithelium, that could ease a greater permeation of the bacterial LPS therefore, raising its levels in the bloodstream (48, 57). Another finding observed by our study that reinforces this hypothesis is that BMI correlated negatively with the villi/crypt relationship, emphasizing once again the thesis that an epithelial derangement could be present in individuals with obesity. Based on this hypothesis, we would expect to find some other relationships between the LPS and the

structural proteins of the epithelium which could not be confirmed by our data. Moreover, LPS showed no correlation with the hepatic elastase indexes. This was not expected since previous studies demonstrated the role of this endotoxin in the evolution of fatty liver disease (137).

Among the intestinal proteins of the epithelium presently studied, the most relevant was  $\beta$ -actin as we observed an inverse relationship in the levels of this protein to BMI, PG, insulin, HOMA-IR,  $\gamma$ GT and degree of hepatic fibrosis. This finding ratifies the possible role of disruption of the intestinal epithelium in the pathogenesis of obesity, dysglycemia and liver disease. This protein would have a protective effect, being present in greater amount in those subjects with lower anthropometric indexes, associated with lower rates of inflammation of the liver and insulin resistance. Another important finding was the inverse relationship between IAP with HbA1c, PG, and  $\gamma$ GT. We could hypothesize that in those subjects with dysglycemia and NASH, IAP would have reduced activity that impacts the clearance of LPS and promotes an inflammatory state inherent to these conditions. This finding herein observed in humans was also previously described in animal models (80).

Regarding hepatic elastography indexes, we observed that kPa had a direct relationship with BMI, GPT, PG, insulin, HOMA-IR and TNF- $\alpha$ , in consonance with the pathophysiological mechanisms of NAFLD. Similarly, CAP (fat content) was directly related to WC, WHR, BMI, GOT, GPT, PG, insulin, ferritin, TNF- $\alpha$ , and leptin. These findings reinforce concepts already known that demonstrated the role of excessive adiposity in the evolution of NAFLD (33, 65). One interesting finding was the inverse association of kPa with  $\beta$ -actin, possibly denoting aspects related to protection of hepatic damage.

Our secondary objective was to compare groups of individuals with different degrees of tolerance to PG and body adiposity in many clinical aspects. Overall, the OBD group had the highest anthropometric and biochemical indexes when compared to OB and C groups. The inflammatory biomarkers also showed higher levels in the OBD group as well as the kPa and CAP. On the other hand, LPS, structural proteins and histomorphometric analysis did not reveal differences among groups, except for IAP which presented lower activity in the OBD group when compared to the controls. In the medical literature, IAP is shown to influence the intestinal microbiota, display an inverse relationship to intestinal permeability and to have a preventive effect on the metabolic syndrome (238). Although LPS showed the correlations mentioned above, its levels did not differ among groups. Although our results did not show significant differences among the groups, we should highlight a possible biological tendency of a lower expression of  $\beta$ -actin in the OBD and OB groups.

In the analysis of the intestinal microbiota composition, we highlight the sizeable inter-individual variability among the participants of all study groups, as well as the absence of a statistically significant difference among the study groups for the Bacteroidetes and Firmicutes phyla. Some studies point to the relationship between body fat and intestinal microbiota, especially in the relation between Bacteroidetes and Firmicutes (191, 192), while others have not been able to prove it (31, 194). Most of the great variability presently observed may be due to the multiple factors that could have influenced the composition of the microbiota. Among them, dietary, environmental, immunological, bile flow modifications, alterations in gastric pH, intestinal dysmotility should be considered (127). Although we still consider an important point to be studied, these factors turn the investigation of intestinal microbiota a challenge and standardization of accurate methods for this investigation need to be implemented.

Since dietary habits may influence the composition of the intestinal microbiota, we used the Food Frequency Questionnaire and graded individual dietary intake which was previously validated in our population (239). The studied groups showed homogeneity concerning the consumption of calories, lipids, and carbohydrates but presented a difference in protein consumption which was higher in OBD compared to the OB group ( $p=0.05$ ). This finding, added to a lack of significant differences in LPS levels, suggests that maybe diet could modify the composition of the intestinal microbiota (200). In our understanding, it is possible that the observed standardization of the diet may have been a factor responsible for the absence of differences in microbiota composition and LPS in the present study, as was previously described (199). Additionally, most of the studies that analyzed LPS and the microbiota used high-fat diets in at least one of the groups (57, 70, 80) as a way to accentuate the difference of the postprandial markers. However, we decided to investigate the subjects' LPS and others biomarkers after a standard liquid meal for all groups.

Among the limitations of our study, the first one refers to the cross-sectional design as mentioned above. However, faced with so many contradictions in the literature, our objective was to demonstrate associations for future analyzes, preferably with prospective and longitudinal designs. Another one is the observed predominance of females, in addition to age differences between the OBD and OB groups. (231, 232).

Despite the limitations described above, we were able to extract some relevant information in this work. Firstly, we selected a population with a reasonably similar diet, evaluated by FFQ, which may have reflected the absence of differences between the Bacteroidetes and Firmicutes phyla in the intestinal microbiota, as well as the LPS levels.

This hypothesis demonstrates the role of diet in the evaluation of the intestinal microbiota, as has already been suggested by others (199, 215). Another relevant finding was IAP results which we were able to demonstrate its lower activity in the OBD group, in addition to its negative correlation with  $\gamma$ GT, reiterating the possible role of IAP in obesity and dysglycemia, a phenotype observed as metabolic syndrome. This observed association could serve as the basis for new clinical studies, with IAP as a target and the possible role to prevent morbidities.  $\beta$ -actin also showed an interesting correlation to BMI, glycemic and hepatic indexes suggesting a possible protective role. Recently, some authors showed that intestinal permeability is increased in patients with obesity and steatosis when compared to those without steatosis (234).

## **5. Conclusion**

Few studies have evaluated the intestinal mucosa in humans, associating it with inflammatory biomarkers, intestinal microbiota, and hepatic elastography. Among them, almost all tested only biomarkers (65, 75, 79, 234, 240) with little regard being given to histomorphological and functional changes in intestinal epithelial proteins. Similarly, data on IAP and its relationship with microbiota composition and obesity remain scarce in the literature, with most of the research being performed on animal models.

Importantly, we demonstrated that IAP is more active in lean subjects compared to those with excessive adiposity. Also, we found direct associations between IAP and markers of insulin resistance. On the counterpart, we demonstrated a possible protective role of  $\beta$ -actin and the relationship between specific histomorphometric variables and LPS, showing that the intestinal epithelium may be altered in the inflammatory phenotype present in the metabolic syndrome. In the future, to allow a better understanding of the pathophysiology of obesity and some of its comorbidities, we suggest studies to better investigate the associations mentioned above.

## References

1. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(7):1761-72. doi: db06-1491 [pii];10.2337/db06-1491 [doi].
2. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57(6):1470-81. doi: db07-1403 [pii];10.2337/db07-1403 [doi].
3. Tsukumo DM, Carvalho BM, Carvalho-Filho MA, Saad MJ. Translational research into gut microbiota: new horizons in obesity treatment. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009;53(2):139-44. doi: S0004-27302009000200004 [pii].
4. Blaut M, Klaus S. Intestinal microbiota and obesity. *Handbook of experimental pharmacology*. 2012(209):251-73. doi: 10.1007/978-3-642-24716-3\_11. PubMed PMID: 22249818.
5. Teixeira TF, Souza NC, Chiarello PG, Franceschini SC, Bressan J, Ferreira CL, et al. Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors. *Clin Nutr*. 2012;31(5):735-40. doi: S0261-5614(12)00038-6 [pii];10.1016/j.clnu.2012.02.009 [doi].
6. Ding S, Lund PK. Role of intestinal inflammation as an early event in obesity and insulin resistance. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2011;14(4):328-33. doi: 10.1097/MCO.0b013e3283478727. PubMed PMID: 21587067; PubMed Central PMCID: PMC3650896.
7. de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, Hartman AL, Rutledge JC, Raybould HE. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299(2):G440-G8. doi: ajpgi.00098.2010 [pii];10.1152/ajpgi.00098.2010 [doi].
8. Malo MS, Moaven O, Muhammad N, Biswas B, Alam SN, Economopoulos KP, et al. Intestinal alkaline phosphatase promotes gut bacterial growth by reducing the concentration of luminal nucleotide triphosphates. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2014;306(10):G826-38. doi: 10.1152/ajpgi.00357.2013. PubMed PMID: 24722905; PubMed Central PMCID: PMC4024727.
9. Kaliannan K, Hamarneh SR, Economopoulos KP, Nasrin Alam S, Moaven O, Patel P, et al. Intestinal alkaline phosphatase prevents metabolic syndrome in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(17):7003-8. doi: 10.1073/pnas.1220180110. PubMed PMID: 23569246; PubMed Central PMCID: PMC3637741.
10. Moschen AR, Kaser S, Tilg H. Non-alcoholic steatohepatitis: a microbiota-driven disease. *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24(11):537-45. doi: 10.1016/j.tem.2013.05.009. PubMed PMID: 23827477.
11. American Diabetes A. Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes care*. 2014;37 Suppl 1:S14-80. doi: 10.2337/dc14-S014. PubMed PMID: 24357209.
12. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-9. PubMed PMID: 3899825.

13. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108 Suppl 1:4516-22. doi: 1000080107 [pii];10.1073/pnas.1000080107 [doi].
14. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*. 2009;75(23):7537-41. doi: 10.1128/AEM.01541-09. PubMed PMID: 19801464; PubMed Central PMCID: PMC2786419.
15. Ruiz AG, Casafont F, Crespo J, Cayon A, Mayorga M, Estebanez A, et al. Lipopolysaccharide-binding protein plasma levels and liver TNF-alpha gene expression in obese patients: evidence for the potential role of endotoxin in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Obesity surgery*. 2007;17(10):1374-80. doi: 10.1007/s11695-007-9243-7. PubMed PMID: 18000721.
16. Lalles JP. Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects. *Nutrition reviews*. 2014;72(2):82-94. doi: 10.1111/nure.12082. PubMed PMID: 24506153.
17. Dumas ME, Barton RH, Toye A, Cloarec O, Blancher C, Rothwell A, et al. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(33):12511-6. doi: 10.1073/pnas.0601056103. PubMed PMID: 16895997; PubMed Central PMCID: PMC1567909.
18. Rautava S, Luoto R, Salminen S, Isolauri E. Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2012;9(10):565-76. doi: 10.1038/nrgastro.2012.144. PubMed PMID: 22890113.
19. Fleissner CK, Huebel N, Abd El-Bary MM, Loh G, Klaus S, Blaut M. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. *The British journal of nutrition*. 2010;104(6):919-29. doi: 10.1017/S0007114510001303. PubMed PMID: 20441670.
20. Duncan SH, Lopley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(11):1720-4. doi: 10.1038/ijo.2008.155. PubMed PMID: 18779823.
21. Leung C, Rivera L, Furness JB, Angus PW. The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2016;13(7):412-25. doi: 10.1038/nrgastro.2016.85. PubMed PMID: 27273168.
22. JE RS. Validity of a Brazilian frequency questionnaire against dietary recalls and estimated energy intake. *Nutrition Research*. 1998;18(10).
23. Gerard P. Gut microbiota and obesity. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(1):147-62. doi: 10.1007/s00018-015-2061-5. PubMed PMID: 26459447.
24. Carmody RN, Gerber GK, Luevano JM, Jr., Gatti DM, Somes L, Svenson KL, et al. Diet dominates host genotype in shaping the murine gut microbiota. *Cell Host Microbe*. 2015;17(1):72-84. doi: 10.1016/j.chom.2014.11.010. PubMed PMID: 25532804; PubMed Central PMCID: PMC4297240.
25. Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *The American journal of clinical nutrition*. 2007;86(5):1286-92. doi: 10.1093/ajcn/86.5.1286. PubMed PMID: 17991637.

26. Ghosh R, Gilda JE, Gomes AV. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert Rev Proteomics*. 2014;11(5):549-60. doi: 10.1586/14789450.2014.939635. PubMed PMID: 25059473; PubMed Central PMCID: PMC4791038.
27. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(7):1016-9. PubMed PMID: 10895825.
28. Dibaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA, Rittmann BE. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo ClinProc*. 2008;83(4):460-9. doi: S0025-6196(11)60702-7 [pii];10.4065/83.4.460 [doi].
29. Damms-Machado A, Louis S, Schnitzer A, Volynets V, Rings A, Basrai M, et al. Gut permeability is related to body weight, fatty liver disease, and insulin resistance in obese individuals undergoing weight reduction. *The American journal of clinical nutrition*. 2017;105(1):127-35. doi: 10.3945/ajcn.116.131110. PubMed PMID: 28049662.
30. Teixeira TF, Collado MC, Ferreira CL, Bressan J, Peluzio MC. Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability. *NutrRes*. 2012;32(9):637-47. doi: S0271-5317(12)00159-5 [pii];10.1016/j.nutres.2012.07.003 [doi].
31. Savassi-Rocha AL, Diniz MT, Vilela EG, Diniz Mde F, Sanches SR, da Cunha AS, et al. Changes in intestinal permeability after Roux-en-Y gastric bypass. *Obesity surgery*. 2014;24(2):184-90. doi: 10.1007/s11695-013-1084-y. PubMed PMID: 24101087.
32. Brignardello J, Morales P, Diaz E, Romero J, Brunser O, Gotteland M. Pilot study: alterations of intestinal microbiota in obese humans are not associated with colonic inflammation or disturbances of barrier function. *AlimentPharmacolTher*. 2010;32(11-12):1307-14. doi: 10.1111/j.1365-2036.2010.04475.x [doi].

## Figure Legends

Figure 1. Histomorphometric analysis

- |   |   |                            |
|---|---|----------------------------|
| 1 |  | Total epithelial thickness |
| 2 |  | Crypt height               |
| 3 |  | Villus height              |
| 4 |  | Villi diameter I           |
| 5 |  | Villi diameter II          |

Figure 2. The activity of intestinal alkaline phosphatase among groups

Figure 3. Proportion of Bacteroidetes and Firmicutes phyla among groups

Figure 4. Correlations of LPS<sub>AUC</sub> with anthropometric markers and ferritin

Figure 5. Linear correlation of beta-actin to anthropometric and glycemic variables

## Table legends

Table 1. Clinical and biochemical characteristics of subjects

Data expressed as mean  $\pm$  standard deviation, median [1st-3rd quartiles] or n (%). \* P <0.05. † P <0.01. ‡ P <0.001. BMI - body mass index; WC - abdominal circumference, HQ - hip circumference; WHR - waist / hip ratio; SAH: systemic arterial hypertension; GJ - fasting glycemia; HOMA-IR - model of homeostatic evaluation – insulin resistance; HbA1c - glycated hemoglobin; CT - total cholesterol; HDL - HDL cholesterol; LDL - LDL cholesterol; TG - triglycerides; BT - total bilirubin ; GOT - glutamic-oxaloacetic transpeptidase; GPT - glutamic-pyruvic transpeptidase;  $\gamma$ GT-gamma-glutamyl transferase; FALC-alkaline phosphatase; Adipo - adiponectin; IL-6-interleukin-6; TNF- $\alpha$  - tumor necrosis factor alpha; RBP4 - retinol 4 binding protein ; LBP - LPS binding protein; LM – lean mass; FM – fat mass. All comparisons were made in the following order: C vs. OBD; C vs. OB; OBD vs. OB

Table 2. Comparison of biochemical tests between groups

Figure 1.

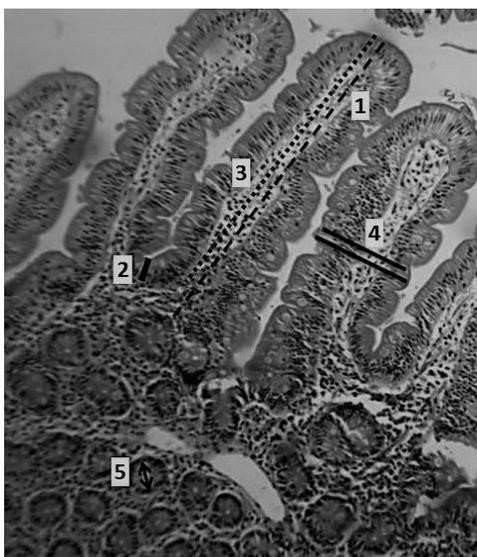


Figure 2.

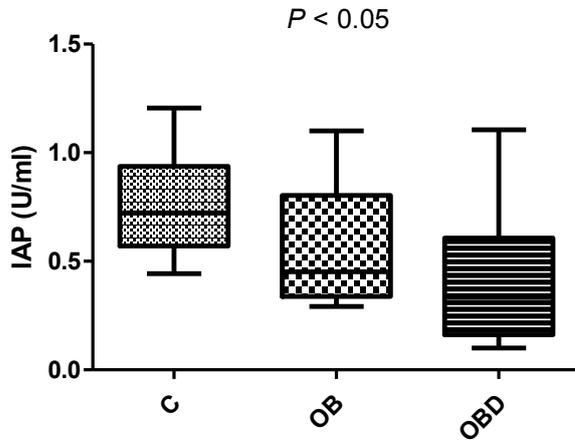


Figure 3.

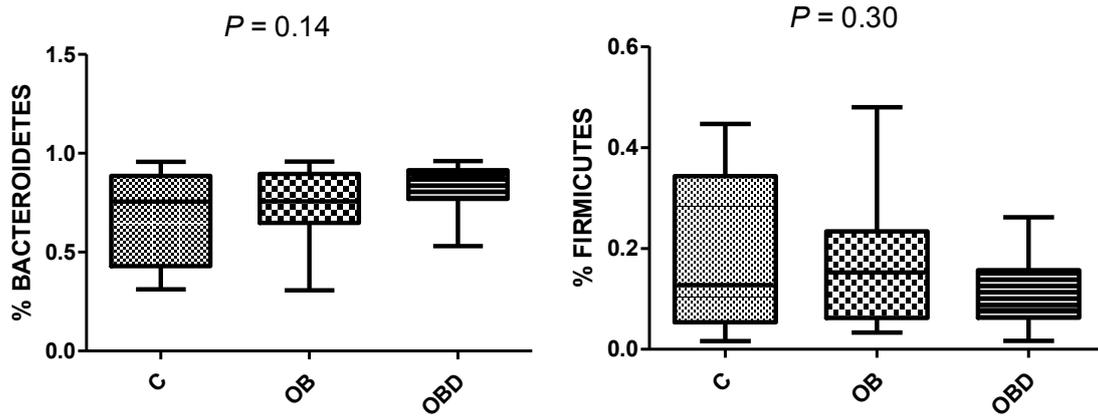


Figure 4.

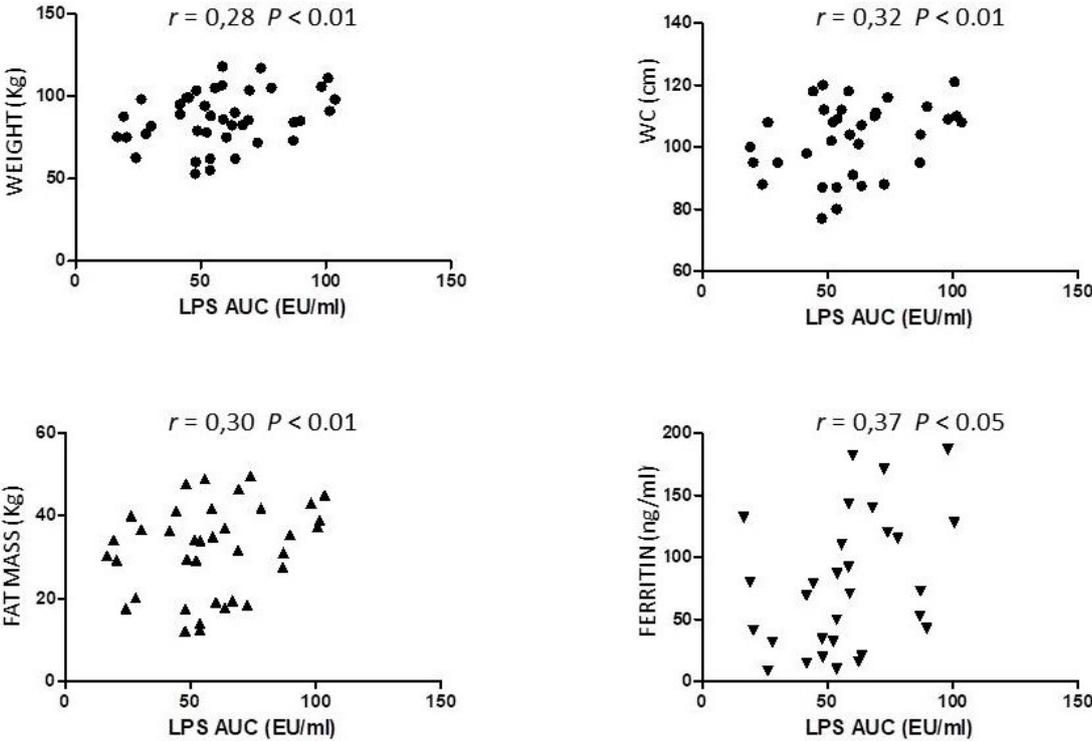


Figure 5.

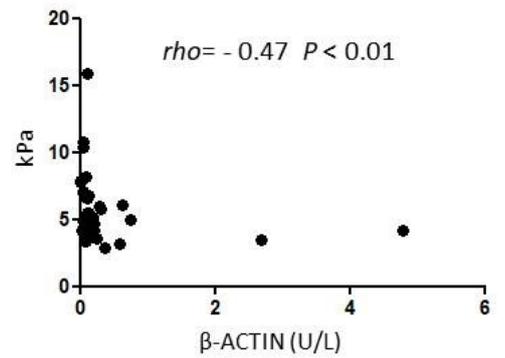
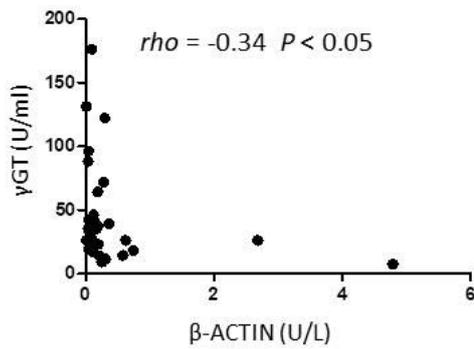
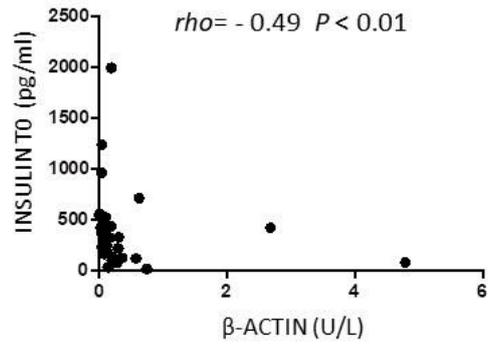
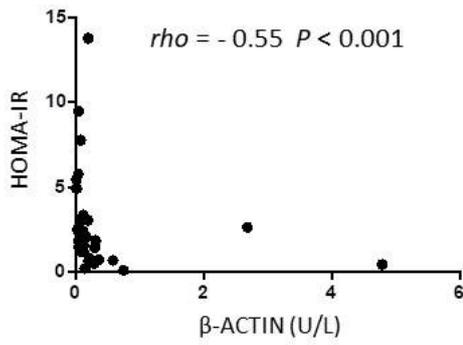
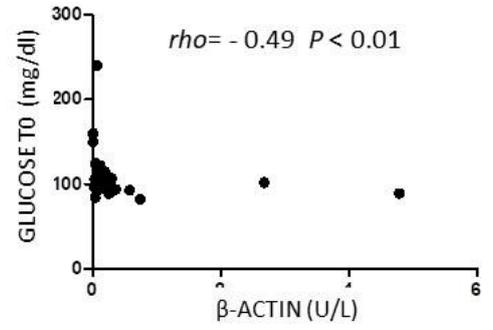
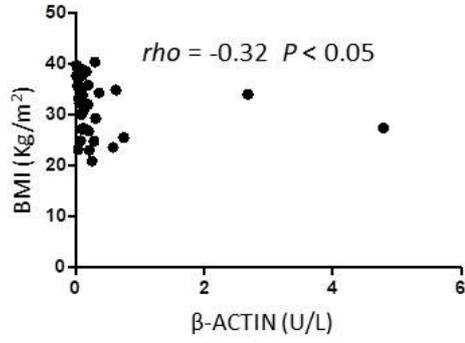


Table 1.

	Total (n = 46)	Group C (n = 16)	Group OB (n = 15)	Group OBD (n = 15)	P
Age (years)	38.3 ± 7.8	39.2 ± 7.45	33 ± 7.81*	41.69 ± 6.18*	<b>0.02</b>
Women[n, (%)]	38 (82.6%)	10 (62.5%)	13 (86.6%)	15 (100%)	
Weight (kg)	89.42 ± 16.11	71.36 ± 11.25††	98.87 ± 12.76†	93.25 ± 12.07†	<b>0.0008</b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	32.63 ± 5.08	25.5 ± 2.34‡‡	34.97 ± 3.42‡	35.22 ± 2.62‡	<b>&lt;0.0001</b>
WC (cm)	104.6 ± 11.39	89.5 ± 7.45‡†	112.1 ± 6.17†	108.4 ± 7.06‡	<b>0.0006</b>
HQ (cm)	115 [110 – 122]	99 [95.75 – 107]*†	116 [113 – 127]†	114.5 [110 – 122]*	<b>0.02</b>
WHR	0.9 [0.87 – 0.95]	0.88[0.82 – 0.91]	0.94 [0.88 – 0.95]	0.9 [0.88 – 0.99]	0.15
SHA [n, (%)]	10 (21.7%)	0	2 (13.3%)	8 (53.3%)	
GJ (mg/dL)	104 [96.5 – 115.5]	99 [93 – 109]‡	101 [94.75 – 104.5]†	118.5 [113.8 – 152.5]‡†	<b>0.0001</b>
Insulin (pg/ml)	299 [158.5 – 453]	136[89.84 – 276]‡	310.5[228.8 – 390]	451 [319 – 557]‡	<b>0.0013</b>
HOMA-IR	1.79 [0.93 – 3.05]	0.79 [0.51 – 1.77]‡	1.78 [1.43 – 2.46]	3.21 [1.78 – 6.03]‡	<b>0.0011</b>
HbA1c	5.4 [5.3 – 5.9]	5.3 [5.0 – 5.4]‡	5.5 [5.3 – 5.6]	6.1 [6.0 -8.4]‡	<b>&lt;0.0001</b>
CT (mg/dL)	179.2 ± 31.87	183.4 ± 33.94	178.7 ± 38.87	175 ± 23.46	0.34
HDL (mg/dL)	49 [39.50 - 57.75]	51.5 [42 – 59.75]	54 [40 – 62.5]	46 [39 – 49]	0.225
LDL (mg/dL)	108 [93 – 122.5]	106 [93 – 133]	104 [88 – 117.5]	111 [93 – 119]	0.85
TG (mg/dL)	98 [71.75 - 143.8]	96.5 [74.25 – 131.5]	83 [65 – 135.5]	118 [86 – 155]	0.22
BT (mg/Dl)	0.45 [0.38 - 0.62]	0.62 [0.48 – 1.01]†	0.43 [0.3 – 0.65]	0.39 [0.33 - 0.44]†	<b>0.0017</b>
GOT (U/l)	17 [13 – 22]	16.5 [12 – 19]	16 [13.5 – 22]	18.5 [13 – 25]	0.64
GPT (U/l)	17.5 [11.75 – 26]	11 [9 – 23.5]*	17 [12 – 24]	24.5 [16.25 – 34.75]*	0.054
γGT (U/l)	33 [23 – 43.5]	23 [13.75 – 38.25]*	26 [19 – 39]	37 [27 – 96]*	<b>0.019</b>
FALC (U/l)	78 [59 – 88]	54 [45 – 72.5]	79 [69 – 82.75]	88.5 [69 – 101]	<b>0.012</b>
Ferritin (µg/ml)	71.6 [31.92–122.1]	41.9 [19.5 – 147.8]	86.9 [25.76 – 121.5]	72.5 [52.36 – 92]	0.98
Adipo (µg/ml)	3.59 [2.7–5.1]	3.27 [2.78 – 3.82]	4.57 [2.86 – 7.22]	3.28 [2.22 - 3.89]	0.27
IL-6 (pg/mL)	2.03 [1.32–3.67]	1.32 [0.94 – 1.74]†*	2.59 [1.52 – 4.45]*	3.53 [2.03 – 4.22]†	<b>0.0054</b>
TNF-α (pg/ml)	0.71 [0.46–0.98]	0.6 [0.36 – 0.85]*	0.64 [0.44 – 0.98]	0.9 [0.66 – 1.15]*	0.055
RBP4 (µg/ml)	25.57 [22.57–29.82]	26.06 [22.98 –32.84]	23.89 [21.4 – 26.77]	25.65 [23.41 –30.23]	0.14
LBP (µg/ml)	23.28 [20.79–27.72]	23.58 [19.43 –26.67]	23.58 [22.02 – 30.6]	22.98 [20.89 –27.67]	0.26
Leptin (ng/ml)	32.04 ± 17.68	16.21 ± 10.77‡‡	43.38 ± 16.05‡	39.39 ± 11.91‡	<b>&lt;0.0001</b>
LM (kg)	53.3 [47.38 – 58.3]	48.15 [43.03-56.58]	56.2 [49.8-61.5]	53 [50.9-58.6]	0.06
FM (%)	61.45 [58.88 –71.13]	74 [71.13-75.48]‡‡	60.1 [56.9-63]‡	59.3[58.4-61.6]‡	<b>&lt;0.0001</b>
LM (kg)	34.15 [20.03 –40.38]	18.1 [14.93-20.03]‡‡	35.4 [31.7-46.5]‡	37 [31.1-41.8]‡	<b>&lt;0.0001</b>
FM (%)	38.55 [28.88 –41.13]	25.65[23.75-28.48]††	41.3% [36.63-45.05]†	40.7 [38.1-41.35]†	<b>0.0008</b>

Table 2.

	<b>Group C</b> <b>(n = 16)</b>	<b>Group OB</b> <b>(n = 15)</b>	<b>Group OBD</b> <b>(n = 15)</b>	<b>P</b>
<b>Glucose 0</b>	99 [93 – 109]‡	101 [94.75 – 104.5]†	118.5 [113.8 – 152.5]‡†	<b>0.0001</b>
<b>Glucose 30</b>	111 [101 – 120.5]*	110.5 [96 – 119.5]†	137 [118 – 196.8]*†	<b>0.0016</b>
<b>Glucose 60</b>	119 [102.5 – 128]‡	108 [98 – 120]‡	156.5 [133.3 – 217.8]‡‡	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>Insulin 0</b>	136 [89.84 – 276]‡	310.5 [228.8 – 390]	451 [319 – 557]‡	<b>0.0013</b>
<b>LPS</b>	1,02 [0,47 – 1,47]	1,17 [0,91 – 1,5]	1,1 [0,53 – 1,65]	0,6
<b>LBP</b>	23,58 [19,43 – 26,67]	23,58 [22,02 – 30,6]	22,98 [20,89 – 27,67]	0,26
<b>GLP-1</b>	0,63 [0,53 – 0,94]	0,59 [0,5 – 0,73]	0,84 [0,63 – 0,89]	0,13

## Instruções para a coleta das fezes

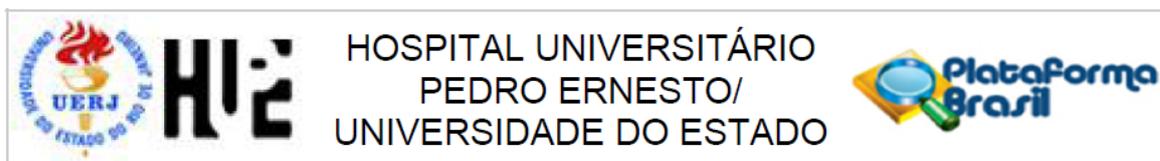


**Antes de iniciar a coleta:** Colocar todos os pacotes de gel no freezer por no mínimo 12 horas (total: 35 pacotes)

<p><b>Passo 1:</b> Levante a tábua do vaso sanitário. Coloque o suporte na parte de trás do vaso sanitário, prendendo os 4 cantos</p>		<p><b>Passo 2:</b> Abaixar a tábua do vaso. Coloque o pote dentro do suporte</p>		<p><b>Passo 3:</b> Urine fora do pote antes. Colete as fezes direto no pote. Não urine dentro do pote. Se acontecer, lave e seque o pote. Colete as fezes.</p>		<p><b>Passo 4:</b> Após a coleta sua amostra, retire o pote do suporte</p>		<p><b>Passo 5:</b> Colocar o pote sobre uma superfície plana e pressionar firmemente a tampa fechada</p>	
<p><b>Passo 6:</b> Colocar o pote dentro do saco plástico e fechá-lo.</p>		<p><b>Passo 7:</b> Colocar 07 pacotes de gel no fundo da caixa térmica</p>		<p><b>Passo 8:</b> Pôr o pote na caixa (com o saco junto)</p>		<p><b>Passo 9:</b> Pôr pacotes de gel em volta do pote</p>		<p><b>Passo 10:</b> Pôr o restante dos pacotes de gel em cima do pote e fechar a caixa térmica</p>	

**Após a coleta:** Anote a data e horário de coleta. Entregar a caixa no hospital em até 24 horas. Qualquer dúvida ligar para : (21) 2334-0703 (Elisa) ou (21) 78253140

## ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética do HUPE – UERJ



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** CORRELAÇÃO ENTRE MICROBIOTA INTESTINAL, BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS, MORFOLOGIA INTESTINAL, GRAU DE FIBROSE HEPÁTICA E REATIVIDADE VASCULAR EM PACIENTES COM DIFERENTES GRAUS DE TOLERÂNCIA À GLICOSE E ADIPOSIDADE CORPORAL.

**Pesquisador:** Luiz Guilherme Kraemer de Aguiar

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 22032113.9.0000.5259

**Instituição Proponente:** Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ

**Patrocinador Principal:** Laboratório de pesquisas clínicas e experimentais em biologia vascular

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 419.676

**Data da Relatoria:** 09/10/2013

**Apresentação do Projeto:**

Projeto bem estruturado e detalhado em todas as suas fases

**Objetivo da Pesquisa:**

Estudar em grupos de eutróficos e obesos com tolerância normal à glicose e também de obesos e eutróficos/sobrepeso com disglícemia a correlação entre os marcadores séricos inflamatórios, reatividade vascular, grau de inflamação/fibrose hepáticas e morfologia e microbiota intestinais.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos são baixos e podem ocorrer durante a realização do procedimento de endoscopia digestiva alta, sendo representados principalmente por depressão respiratória, perfuração gastrointestinal, broncoaspiração do conteúdo gástrico em caso de vômitos. No entanto, os riscos são reduzidos, pois a realização das endoscopias digestivas será intra-hospitalar e por equipe altamente especializada treinada no Serviço de Gastroenterologia do HUPE/UERJ. O método do FibroScan é inócua, não trazendo riscos ao paciente, assim como os

**Endereço:** Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

**Bairro:** Vila Isabel

**CEP:** 20.551-030

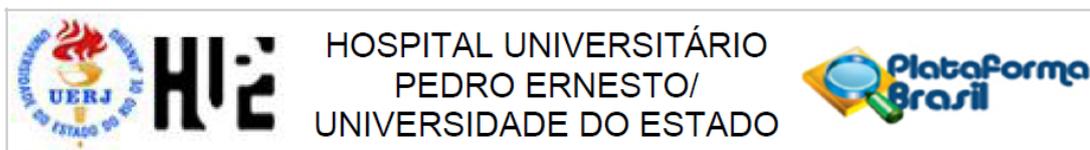
**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)2868-8253

**Fax:** (21)2264-0853

**E-mail:** cep-hupe@uerj.br



Continuação do Parecer: 419.676

métodos de tonometria digital, laser-Doppler  
fluxometria e visualização da microcirculação nutritiva cutânea.

**Benefícios:**

A obesidade é atualmente a doença crônica não-comunicável mais prevalente em nosso meio, impondo aos seus portadores risco cardiovascular, metabólico e de doença hepática. Nossa proposta é demonstrar com esse estudo conforme detalhadamente exposto um novo aspecto na etiopatogenia e na fisiopatologia da obesidade e de suas comorbidades. O impacto destes resultados pode adicionar conhecimento ao estudo da obesidade e sugestão de estudos de intervenção para redução de risco cardio-metabólico na população brasileira.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Nenhum

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Adequados

**Recomendações:**

Nenhuma

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto aprovado sem pendências

**Situação do Parecer:**

Aprovado

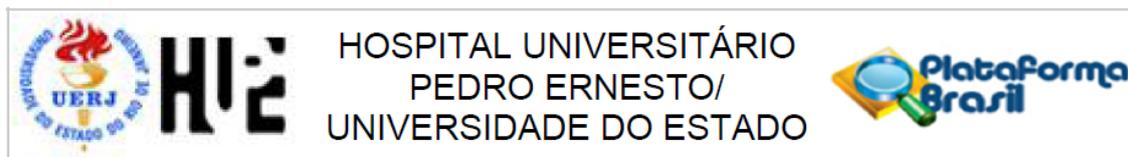
**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas. 2. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes. 3. O Comitê de Ética solicita a V. S<sup>a</sup>., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

**Endereço:** Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo  
**Bairro:** Vila Isabel **CEP:** 20.551-030  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br



Continuação do Parecer: 419.676

RIO DE JANEIRO, 09 de Outubro de 2013

---

**Assinador por:**  
**WILLE OIGMAN**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo  
**Bairro:** Vila Isabel **CEP:** 20.551-030  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br

## ANEXO C – Definição das OTUs

OTU	TAM.	TAXONOMIA
Otu02	828351	R: Bacteria; F:Bacteroidetes; C:Bacteroidia; O:Bacteroidales; Fa:Bacteroidaceae; G:Bacteroides NC
Otu10	96293	R: Bacteria; F:Bacteroidetes; C:Bacteroidia; O:Bacteroidales; Fa:Porphyromonadaceae; G:Parabacteroides NC
Otu26	41732	R: Bacteria; F:Bacteroidetes; C:Bacteroidia; O:Bacteroidales; Fa:Paraprevotellaceae; G:Prevotella NC
Otu30	37059	R: Bacteria; F:Firmicutes; C:Clostridia; O:Clostridiales; Fa:Veillonellaceae; G:Dialister NC
Otu31	36177	R: Bacteria; F:Firmicutes NC
Otu35	29907	R: Bacteria; F:Bacteroidetes; C:Bacteroidia; O:Bacteroidales; Fa:S24-7 NC
Otu41	25866	R: Bacteria; F:Tenericutes; C:Mollicutes; O:RF39 NC
Otu42	24342	R: Bacteria; F:Firmicutes; C:Clostridia; O:Clostridiales; Fa:Lachnospiraceae; G:Butyrivibrio; E:Crossotus
Otu43	24125	R: Bacteria; F:Proteobacteria NC
Otu55	17395	R: Bacteria; F:Bacteroidetes; C:Bacteroidia; O:Bacteroidales; F:Bacteroidaceae; G:Bacteroides NC
Otu56	16927	R: Bacteria; F:Firmicutes; C:Clostridia; O:Clostridiales; Fa:Ruminococcaceae NC
Otu57	16396	R: Bacteria; F:Firmicutes; C:Clostridia; O:Clostridiales; Fa:Ruminococcaceae; G:Oscillospira NC
Otu70	12793	R: Bacteria; F:Firmicutes; C:Clostridia; O:Clostridiales; Fa:Ruminococcaceae; G:Oscillospira NC
Otu74	10981	R: Bacteria; F:Firmicutes; C:Clostridia; O:Clostridiales; Fa:Veillonellaceae; G:Phascolarctobacterium NC
Otu78	10358	R: Bacteria; F:Firmicutes; C:Clostridia; O:Clostridiales; Fa:Ruminococcaceae; G:Faecalibacterium; E:prausnitzii
Otu83	9338	R: Bacteria; F:Firmicutes NC
Otu86	8633	R: Bacteria; F:Bacteroidetes; C:Bacteroidia; O:Bacteroidales; Fa:Rikenellaceae não classificada
Otu92	6698	R: Bacteria; F:Firmicutes; C:Clostridia; O:Clostridiales NC
Otu103	61	R: Bacteria; F:Bacteroidetes; C:Bacteroidia; O:Bacteroidales; Fa:Bacteroidaceae; G:Bacteroides NC
Otu106	5987	R: Bacteria; F:Firmicutes; C:Clostridia; O:Clostridiales; Fa:Lachnospiraceae; G:Coprococcus; E:Eutactus
Otu111	5549	R: Bacteria NC
Otu113	5511	R: Bacteria; F:Proteobacteria; C:AlphaProteobacteria; O:RF32 NC
Otu116	5372	R: Bacteria; F:Proteobacteria; C:GammaProteobacteria; O:Pasteurellales; Fa:Pasteurellaceae; G:Haemophilus; E:parainfluenzae
Otu126	4846	R: Bacteria; F:Firmicutes; C:Clostridia; O:Clostridiales; Fa:Ruminococcaceae NC
Otu129	4582	R: Bacteria; F:Firmicutes; C:Clostridia; O:Clostridiales; Fa:Ruminococcaceae NC
Otu130	4554	R: Bacteria; F:Tenericutes; C:Mollicutes; O:RF39 NC
Otu133	4243	R: Bacteria; F:Verrucomicrobia; C:Opitutae; O:Cerasicoccales; Fa:Cerasicoccaceae NC
Otu140	3954	R: Bacteria; F:Proteobacteria; C:BetaProteobacteria; O:Burkholderiales; Fa:Alcaligenaceae; G:Sutterella
Otu141	3949	R: Bacteria; F:Firmicutes; C:Clostridia; O:Clostridiales NC
Otu145	3594	R: Bacteria; F:Proteobacteria; C:BetaProteobacteria; O:Burkholderiales NC
Otu153	3236	R: Bacteria; F:Firmicutes; C:Clostridia; O:Clostridiales; Fa:Clostridiaceae; G:Clostridium NC
Otu155	3181	R: Bacteria; F:Firmicutes; C:Clostridia; O:Clostridiales NC
Otu157	3044	R: Bacteria; F:Firmicutes; C:Clostridia; O:Clostridiales; Fa:Veillonellaceae; G:Phascolarctobacterium NC
Otu160	29	R: Bacteria; F:Firmicutes; C:Clostridia; O:Clostridiales; Fa:Lachnospiraceae; G:Lautia NC
Otu167	2710	R: Bacteria NC
Otu171	2654	R: Bacteria NC
Otu185	2223	R: Bacteria; F:Firmicutes; C:Clostridia; O:Clostridiales; Fa:Clostridiaceae; G:Clostridium; E:Celatum
Otu198	1949	R: Bacteria; F:Bacteroidetes NC
Otu213	1591	R: Bacteria; F:Firmicutes; C:Clostridia; O:Clostridiales; Fa:Lachnospiraceae NC

**Legenda.** R: Reino; F: Filo; C: Classe; O: Ordem; Fa: Família; G: Gênero; E: Espécie; NC: não classificado