

JANICE DA COSTA SILVA VIANA

**MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM ANTIBIÓTICOS E SEUS
EFEITOS SOBRE A HIPERGLICEMIA INDUZIDA POR ATORVASTATINA EM
CAMUNDONGOS *ob/ob*.**

**BRASÍLIA, DF
2018**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JANICE DA COSTA SILVA VIANA

**MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM ANTIBIÓTICOS E SEUS
EFEITOS SOBRE A HIPERGLICEMIA INDUZIDA POR ATORVASTATINA EM
CAMUNDONGOS *ob/ob*.**

**Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.**

Orientador: Francisco de Assis Rocha Neves
Coorientadora: Angélica Amorim Amato

BRASÍLIA, DF
2018

JANICE DA COSTA SILVA VIANA

MODULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM ANTIBIÓTICOS E SEUS
EFEITOS SOBRE A HIPERGLICEMIA INDUZIDA POR ATORVASTATINA EM
CAMUNDONGOS *ob/ob*.

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 11 de Maio de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves (Presidente)

Universidade de Brasília

Profa. Dra. Adriana Lofrano Alves Porto

Universidade de Brasília

Profa. Dra. Maria de Fátima Borin

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Milton Rocha de Moraes

Universidade Católica de Brasília

Profa. Dra. Djane Braz Duarte (Suplente)

Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Agradecer é admitir que houve um minuto em que se precisou de alguém. Agradecer é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser autossuficiente. Obrigada a todos que compartilharam os prazeres e dificuldades desta jornada, com os quais convivemos durante tantas horas e carregamos a marca de experiências comuns.

À Deus , pela vida e pela força frente às dificuldades.

Aos meus pais, Lanice e José Alberto, por sempre estarem ao meu lado apesar da distância. Por todo o incentivo e apoio as minhas escolhas .

Aos meus tios Lucy e Levi, minha segunda família aqui, onde morei meu primeiro ano em Brasília. Muito obrigada pelo apoio e carinho!

Ao meu esposo, Márcio Viana, incondicional companheiro. Por ser paciente todos esses anos, por muitas vezes abdicar de seus sonhos para realizar os meus. Por ter me acompanhado ao Canadá, durante o doutorado sanduíche, para que eu pudesse concluir os dados deste trabalho. Agradeço por ter sido meu ombro amigo, sempre me apoiando nas dificuldades, me incentivando a prosseguir com paciência, sabedoria e otimismo, principalmente nestes últimos meses, por me trazer a paz e a calma da qual eu precisava. Um único sentimento resume esses agradecimentos: “Amo-te”.

Ao Prof. Dr. Francisco Neves, agradeço por ter aberto as portas do seu laboratório para mim e pelas oportunidades de desenvolver este trabalho.

A Prof. Dra. Angélica Amato agradeço por ter sido muito mais que minha coorientadora. Além de estar sempre disponível para me ajudar em tudo que precisei, por todos os ensinamentos, paciência, amizade, conselhos e por sua empatia. Para mim você é um exemplo de competência, de profissional e de ser humano. Você sabe despertar a admiração de um modo único, e se tornou uma inspiração para todos os alunos. Obrigada por ter me ajudado a superar difíceis obstáculos. Desejo que todos os seus esforços sejam recompensados com muitas bênçãos e alegrias. Minha eterna gratidão!

À Michella Coelho, obrigada por toda força, carinho e amizade. Pela enorme empolgação voltada para este trabalho e por ter se esforçado junto comigo para que este projeto tivesse bons frutos.

Agradeço à professora Lila Missae, da Universidade Federal de São Paulo que me indicou o laboratório do Prof. Dr. André Marrete da *Université Laval*, no Canadá onde fiz o doutorado sanduíche.

Às alunas (equipe) da professora Angélica que me receberam tão bem. Fernanda, Carol, Nady, muito obrigada pela amizade e ajuda nos experimentos.

Ao Sidney muito obrigada pela amizade e por sua ajuda e incentivo nos experimentos deste trabalho.

Aos Profs. Dr. André Marrete e Dra. Geneviève Pillon que me receberam tão bem na *Université Laval* onde fiz o doutorado sanduíche. Devo salientar que fiquei muito encantada com a cordialidade a qual fui recebida no Laboratório. Sou grata por tudo que aprendi e pela oportunidade de ter realizado os experimentos que faltavam para finalizar este trabalho. *Merci Beaucoup!*

Agradeço também à equipe maravilhosa de alunos e pesquisadores do Prof. Dr. André Marrete que também me receberam tão bem, ajudaram com os experimentos, me ensinaram metodologias novas, deram todas as dicas da cidade, enfim, gratidão pela amizade e carinho de todos. *Je me souviens!*

À Helena, minha sogra, por ter cuidado dos meus três gatinhos, enquanto estive ausente do Brasil.

Aos camundongos, sujeitos experimentais deste trabalho.

Ao CEDEME, pelo fornecimento dos camundongos.

Ao CNPQ e CAPES pelo auxílio financeiro.

Agradeço imensamente por cada mão estendida, pelas palavras de incentivo, colo e escuta fraterna nos momentos difíceis, pelas críticas e correções que almejavam o meu crescimento!

"Disse a flor para o pequeno príncipe: é preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas." (Saint-Exupéry)

"O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece." (Benjamin Disraeli)

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes". (Marthin Luther King)

RESUMO

Introdução: As estatinas são fármacos hipolipemiantes amplamente utilizados na redução do risco cardiovascular. Recentemente, foram relacionadas ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 (DM2). A disbiose microbiana do intestino também está associada a anormalidades na homeostase da glicose, mas seu papel na hiperglicemia induzida pelas estatinas ainda não foi amplamente explorado. No presente estudo, nosso objetivo foi investigar se a modulação da microbiota intestinal com antibióticos poderia modificar a influência da terapia com atorvastatina (ATOR) ou pravastatina (PRAVA) sobre a homeostase da glicose em camundongos *ob/ob*, e se isso poderia associar-se à modificação da representação relativa de populações específicas de bactérias nas fezes destes animais. **Métodos:** Camundongos *ob/ob* com 13 semanas de idade, alimentados com dieta controle, foram tratados com veículo (n = 10), atorvastatina (ATOR) 80 mg/kg/d (n = 10) ou pravastatina (PRAVA) 80 mg/kg/d (n = 10), por 8 semanas. Durante as últimas 4 semanas de tratamento, cinco camundongos de 3 grupos também receberam uma combinação de antibióticos (ciprofloxacina 0,2 g/L e vancomicina 0,5 g/L, administradas na água potável) para promover a modulação da microbiota intestinal. **Resultados:** A terapia com ATOR reduz o peso corporal, na ausência e presença de antibióticos, enquanto a PRAVA e o co-tratamento com PRAVA e antibióticos não afetou o peso corporal. A ATOR aumentou significativamente a glicemia em jejum, e esse efeito foi revertido pela antibioticoterapia. Ao contrário, os camundongos tratados com PRAVA apresentaram glicemia em jejum ligeiramente reduzidos, que foram adicionalmente diminuídos por co-tratamento com antibióticos. Tanto a ATOR como a PRAVA diminuíram a concentração sérica das enzimas hepáticas, e este efeito não foi modificado pelo co-tratamento com antibióticos. No entanto, a diminuição induzida pela estatina no acúmulo de lipídios hepáticos foi parcialmente revertida pelo tratamento simultâneo com antibióticos. O tratamento com ATOR, mas não com PRAVA, reduziu a razão Firmicutes/Bacteroidetes, mas o co-tratamento com antibióticos e com ATOR reverteu parcialmente e promoveu uma expansão significativa de *Akkermansia muciniphila* em comparação com controle ou o tratamento com ATOR isoladamente. **Conclusão:** Nossos achados indicam que a modulação da microbiota intestinal com antibióticos em associação com o tratamento com ATOR pode melhorar o efeito diabetogênico desta estatina, e isso pode envolver a expansão da população de *A. muciniphila* no intestino. Isso sugere que a manipulação da microbiota intestinal pode ser um alvo para prevenir a hiperglicemia induzida pelas estatinas.

Palavras-chave: Obesidade, diabetes, estatinas, microbiota intestinal.

ABSTRACT

Background: Statins are lipid-lowering drugs widely used for cardiovascular risk reduction that are strongly linked to development of type 2 diabetes (T2D). Gut microbial dysbiosis is also associated with abnormalities in glucose homeostasis, but their role in statin-induced hyperglycemia was not largely explored. In the present study, we aimed to investigate whether gut microbiote modulation with antibiotics could affect glucose levels in response to atorvastatin (ATOR) and pravastatin (PRAVA) therapy in ob/ob mice, and whether this was associated with altered relative representation of specific bacteria populations. **Methods:** Thirteen-week old male ob/ob mice fed a control diet were treated with vehicle (n=10), atorvastatin (ATOR) 80 mg/kg/d (n=10) or pravastatin (PRAVA) 80 mg/kg/d (n=10), for 8 weeks. During the last 4 weeks of treatment, five mice from 3 groups also received an antibiotic combination (ciprofloxacin 0.2 g/L and vancomycin 0.5 g/L in drinking water) to promote microbiota modulation. **Results:** ATOR therapy reduced body weight, which was not changed by co-treatment with antibiotics, whereas PRAVA and co-treatment with PRAVA and antibiotics did not affect weight gain. ATOR significantly increased fasting blood glucose levels, and this effect was reversed by antibiotic therapy. On the contrary, mice treated with PRAVA showed slightly decreased fasting blood glucose levels, which were further decreased by co-treatment with antibiotics. Both ATOR and PRAVA diminished serum liver enzyme levels, and this effect was not modified by co-treatment with antibiotics. However, statin-induced decrease in hepatic lipid accumulation was partially reversed by simultaneous treatment with antibiotics. ATOR but not PRAVA treatment reduced Bacteroidetes to Firmicutes ratio, but co-treatment with antibiotics and ATOR partially reversed it and promoted a significant expansion of *Akkermansia muciniphila* as compared to controls or treatment with ATOR alone. **Conclusion:** Our findings indicate that gut microbiote modulation with antibiotics in association with ATOR treatment can ameliorate the diabetogenic effect of this statin, and this may involve expansion of *A. muciniphila* population in the gut. This suggests that gut microbiote manipulation could be a target to prevent statin-induced hyperglycemia.

Key-words: Obesity, diabetes, statins, gut microbiota.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mecanismo de ação das estatinas.....	21
Figura 2 -	Efeito das estatinas na sinalização da insulina.....	28
Figura 3 -	Fatores que influenciam a composição da microbiota intestinal.....	31
Figura 4 -	Delineamento experimental.....	42
Figura 5 -	Efeitos da atorvastatina e da pravastatina no peso corporal de camundongos <i>ob/ob</i> , na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos.....	46
Figura 6 -	Efeitos da atorvastatina e da pravastatina no consumo de dieta de camundongos <i>ob/ob</i> , na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos.....	47
Figura 7 -	Efeitos da atorvastatina e da pravastatina na ingestão hídrica média de camundongos <i>ob/ob</i> , na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos.....	48
Figura 8 -	Efeito da atorvastatina e da pravastatina sobre a adiposidade visceral e subcutânea na 21 ^a semana de vida de camundongos <i>ob/ob</i> machos, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos.....	49
Figura 9 -	Efeitos da atorvastatina e da pravastatina sobre a massa de tecido adiposo marrom interescapular de camundongos <i>ob/ob</i> machos, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos.....	50
Figura 10 -	Efeitos da atorvastatina e da pravastatina sobre a massa do fígado e coração de camundongos <i>ob/ob</i> machos, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos.....	51
Figura 11 -	Efeitos da atorvastatina e da pravastatina sobre as concentrações séricas de glicose e insulina em jejum de camundongos <i>ob/ob</i> machos, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos.....	52
Figura 12 -	Efeitos da atorvastatina e da pravastatina sobre os lipídeos séricos de camundongos <i>ob/ob</i> machos, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos...	55

Figura 13 - Efeitos da atorvastatina e da pravastatina sobre as enzimas hepáticas de camundongos <i>ob/ob</i> machos, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos...	56
Figura 14 - Efeitos da atorvastatina e da pravastatina sobre características morfológicas do fígado após 8 semanas de tratamento de camundongos <i>ob/ob</i> machos, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos.....	57
Figura 15 - Efeitos da atorvastatina e da pravastatina sobre a quantidade de bactérias totais de camundongos <i>ob/ob</i> machos, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos...	58
Figura 16 - Efeitos da atorvastatina e da pravastatina na microbiota intestinal de camundongos <i>ob/ob</i> machos, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos.....	60
Figura 17 - Efeitos da atorvastatina e da pravastatina na microbiota intestinal de camundongos <i>ob/ob</i> machos, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos.....	61
Figura 18 - Efeitos da atorvastatina e da pravastatina na microbiota intestinal de camundongos <i>ob/ob</i> machos, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos.....	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Valores de referência do perfil lipídico para adultos maiores de 20 anos	20
Quadro 2	Doses das estatinas e efeitos sobre o LDL-c.....	22
Quadro 3	Valores de glicose plasmática (em mg/dL) para diagnóstico de Diabetes <i>Mellitus</i> e seus estágios pré-clínicos.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Descrição dos componentes da dieta padrão.....	39
Tabela 2 -	Sequências de <i>primers</i> utilizadas para análise bacteriana por PCR em tempo real.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP: difosfato de adenosina

AKK: *akkermansia muciniphila*

ALT: alanina aminotransferase

AST: asparto aminotransferase

ATOR: Atorvastatina

ATP: trifosfato de adenosina

CoQ10: coenzima Q10

DM2: diabetes *mellitus* tipo 2

DNA: ácido desoxirribonucleico

FPP: farnesil pirofosfato

GGPP: geranilgeranil pirofosfato

GLUT4: transportador de glicose 4

HDL-c: *high density lipoprotein* (lipoproteína de alta densidade)

IDF: *International Diabetes Federation* (Federação Internacional de Diabetes)

IR : Receptor de insulina

KJ: kilojoule

LDL-c: *low density lipoprotein* (lipoproteína de baixa densidade)

PRAVA: Pravastatina

RNA: ácido ribonucleico

WHO: *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

VHE: Veículo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVO	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	DISLIPIDEMIAS	19
3.2	DIABETES	22
3.2.1	<i>Diabetes Mellitus</i> do tipo 2	23
3.3	ESTATINAS E RISCO DE <i>DIABETES MELLITUS</i> DO TIPO 2	25
3.4	MICROBIOTA INTESTINAL	28
3.4.1	Microbiota intestinal, obesidade e diabetes	32
3.4.2	Estatinas e microbiota intestinal	36
4	MÉTODOS	38
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	38
4.2	MODELO ANIMAL	38
4.3	DIETA	39
4.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	40
4.5	DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS	42
4.6	ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL	43
4.6.1	Extração de DNA de amostras de fezes e análise de sequenciamento de RNA 16S	43
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44

5	RESULTADOS	45
5.1	EFEITO DO TRATAMENTO COM ATORVASTATINA E COM PRAVASTATINA SOBRE O PESO CORPORAL, INGESTÃO DE DIETA E INGESTÃO HÍDRICA	45
5.2	EFEITO DA ATORVASTATINA E DA PRAVASTATINA SOBRE A ADIPOSIDADE, MASSA DO CORAÇÃO E DO FÍGADO	49
5.3	EFEITO DA ATORVASTATINA E DA PRAVASTATINA SOBRE A HOMEOSTASE DA GLICOSE E INSULINEMIA	51
5.4	EFEITO DA ATORVASTATINA E DA PRAVASTATINA SOBRE O PERFIL LIPÍDICO	54
5.5	EFEITO DA ATORVASTATINA E DA PRAVASTATINA SOBRE AS ENZIMAS HEPÁTICAS E SOBRE A ESTEATOSE HEPÁTICA	56
5.6	EFEITO DA ATORVASTATINA E DA PRAVASTATINA SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL	58
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÃO	69
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
	ANEXO A- DOCUMENTO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA	83

1 INTRODUÇÃO

A prevalência do *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) está aumentando em todo o mundo e atingindo proporções epidêmicas. De acordo com as estatísticas da IDF (*International Diabetes Federation*), atualmente o diabetes afeta quase 425 milhões de pessoas em todo o mundo. Se nenhuma prevenção for feita, a IDF estima que este número total de pessoas com diabetes poderá dobrar em 2045 (1).

O DM2 tem como importante componente fisiopatológico a resistência insulínica e frequentemente ocorre no contexto da síndrome metabólica. Esta representa um conjunto de fatores de risco cardiovascular que inclui, além da disglucemia, obesidade abdominal, hipertensão arterial, hipertrigliceridemia e baixas concentrações plasmáticas de lipoproteína de alta densidade ou HDL (2). Além da hipertrigliceridemia e HDL baixo, a presença de partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) pequenas e mais aterogênicas (3).

As estatinas são os fármacos mais usados para tratamento das hiperlipidemias em prevenção primária e secundária, com o objetivo de diminuir as concentrações plasmáticas de lipoproteínas ricas em colesterol e reduzir o risco de doenças cardiovasculares (4, 5). Os mecanismos envolvidos nestes efeitos benéficos não são completamente compreendidos, uma vez que a regressão da aterosclerose, um importante componente fisiopatológico da doença arterial coronariana, é mínima em resposta às estatinas (6). Fatores que potencialmente contribuem para a redução do risco são a estabilização da placa aterosclerótica, a melhora da função endotelial e a redução da atividade trombogênica (6).

O perfil de segurança das estatinas é bastante favorável. Representam a classe de hipolipemiantes que menos frequentemente se associa a efeitos adversos (7, 8). Os efeitos desfavoráveis clinicamente mais importantes são a miopatia e disfunção hepática (7, 9). Outros efeitos adversos descritos, mas muito incomuns, são a proteinúria e o comprometimento da função renal (10). Há também preocupações a respeito da potencial associação com comprometimento da função cognitiva (11, 12) e risco de desenvolvimento de câncer (13), embora não haja nenhuma evidência definitiva a esse respeito. Recentemente, foi observado que o

uso das estatinas pode associar-se a efeitos desfavoráveis sobre a homeostase da glicose. Não está claro, entretanto, se este representa um efeito de classe ou se é dependente do tipo específico de estatina (6). Em estudos experimentais, há indícios, inclusive, dos efeitos positivos de algumas estatinas sobre a homeostase da glicose, como é o caso da pravastatina (14).

Os mecanismos implicados na associação, em humanos, entre o uso de estatinas e o risco de DM2 ainda não estão completamente definidos. Acredita-se que tanto a resistência insulínica quanto a disfunção secretória da célula beta estejam implicados (15-17). Estudos experimentais pré-clínicos sugerem uma variedade de mecanismos, incluindo (i) efeitos negativos sobre os canais de cálcio na membrana da célula beta, essenciais à secreção de insulina em resposta à glicose, (ii) redução da translocação do transportador de glicose 4 (GLUT4) para a membrana, essencial à captação de glicose em resposta à insulina, (iii) comprometimento da sinalização intracelular desencadeada pela ligação da insulina ao seu receptor, (iv) inibição da diferenciação de adipócitos e da produção de leptina e adiponectina (18). Seu efeito sobre a microbiota intestinal, entretanto, foi pouco explorado.

A microbiota intestinal representa uma população de trilhões de organismos, em sua maioria bactérias, que habitam o trato digestivo, em especial o intestino, numa situação de simbiose com o hospedeiro. Diversos estudos sugerem que o desequilíbrio da relação entre a microbiota e o hospedeiro, ou a disbiose, associam-se a doenças sistêmicas, como o DM2, a obesidade (19-21). Qualquer composto administrado por via oral e que, assim, atravesse o trato digestivo, apresenta potencial de interferir com as comunidades microbianas que habitam o intestino e, desta forma, resultar em doenças para o hospedeiro. Considerando-se que a via de administração das estatinas é a oral e que estes compostos associam-se a aumento do risco de diabetes, outro mecanismo biologicamente plausível para explicar esta associação é a sua interferência com a microbiota intestinal. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi explorar mecanismos envolvidos na associação entre o uso de estatinas e o DM2, por meio da investigação da associação entre a composição da microbiota intestinal e a homeostase da glicose em resposta ao tratamento com as estatinas em camundongos *ob/ob*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da modulação da microbiota intestinal com antibióticos sobre a ação de estatinas na homeostase da glicose em camundongos *ob/ob* com obesidade e diabetes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar o efeito do tratamento de camundongos *ob/ob* com estatinas sobre:

- Homeostase da glicose (glicemia de jejum, insulinemia) .
- Peso corporal ;
- Consumo alimentar e ingestão hídrica ;
- Perfil lipídico;
- Características histológicas do fígado e concentração sérica de enzimas hepáticas;
- Massa de tecido adiposo visceral e subcutâneo;
- Composição da microbiota intestinal analisada nas fezes (conteúdo bacteriano total, conteúdo de Bacteroidetes, Firmicutes, *Lactobacillus spp* e *Akkermansia muciniphila*).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 DISLIPIDEMIAS

O excesso de gordura corporal e suas consequências metabólicas são epidemias mundiais e representam um grande desafio para a saúde pública de diversos países (22).

Nas últimas décadas, o número de pacientes obesos aumentou consideravelmente (23). As consequências adversas à saúde do excesso de gordura corporal são especialmente correlacionadas com o excesso de tecido adiposo visceral e com a deposição de gordura ectópica em tecidos chave para a homeostase metabólica. Consistentemente, medidas de adiposidade abdominal são diretamente e significativamente associadas com mortalidade (24). A obesidade central frequentemente está presente no contexto da síndrome metabólica (SM), que inclui a resistência à insulina, DM2, hipertensão arterial, síndrome da apnéia obstrutiva do sono, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e dislipidemia, todos fatores de risco para doença cardiovascular (25).

Uma das principais comorbidades associadas com excesso de gordura corporal é a dislipidemia (22), comumente caracterizada por anormalidades lipídicas como elevação da concentração plasmática de triglicérides e LDL, e redução do HDL (26). As concentrações destas variáveis são classificadas como desejáveis, limítrofes, baixas ou altas (Quadro 1). As concentrações séricas de colesterol total (CT) foram avaliadas na população brasileira em regiões específicas. Estudo conduzido em nove capitais, envolvendo 8.045 indivíduos com mediana de idade de 35 +/- 10 anos, no ano de 1998, mostrou que 38% dos homens e 42% das mulheres apresentavam CT acima 200 mg/dL. Neste estudo, os valores do CT foram mais altos no sexo feminino e nas faixas etárias mais elevadas (27).

Quadro 1- Valores de referência do perfil lipídico para adultos maiores de 20 anos.

LIPÍDEOS	VALORES mg/dl	CATEGORIA
CT	< 200	Desejável
	200-239	Limítrofe
	≥ 240	Alto
LDL-c	< 100	Ótimo
	100-129	Desejável
	130-159	Limítrofe
	160-189	Alto
	≥ 190	Muito alto
HDL-c	≥ 60	Desejável
	< 40	Baixo
TG	< 150	Desejável
	150-200	Limítrofe
	200-499	Alto
	≥ 500	Muito alto
Colesterol não-HDL	< 130	Ótimo
	130-159	Desejável
	160-189	Alto
	≥ 190	Muito alto

Fonte: IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose.

A dislipidemia é uma doença heterogênea, com múltiplas etiologias, apresenta causas primárias, que são raras porém requerem a atenção de especialista para seu manejo. Entre elas, incluem-se a deficiência do receptor de LDL e deficiência ou mutação na Apo A-1, uma proteína com papel importante no metabolismo dos lipídeos (28). Entretanto, em grande parte dos casos a dislipidemia é secundária a outros fatores, incluindo obesidade, sedentarismo, tabagismo e hábitos alimentares caracterizados por elevada ingestão de gorduras (29).

Uma das características da síndrome metabólica é a lipemia pós-prandial, caracterizada por eventos metabólicos relacionados ao aumento na concentração sérica de lipoproteínas ricas em triglicérides e reconhecida como componente

importante da desregulação do metabolismo lipídico no fígado com superprodução de partículas de lipoproteína de muita baixa densidade (VLDL1) (30, 31).

Modificação dos hábitos alimentares e programas de atividade física, juntamente com uma terapia medicamentosa, representam o tratamento adequado para controlar as dislipidemias e, assim, reduzir a ocorrência de doenças cardiovasculares. O tratamento medicamentoso das dislipidemias é efetivo e tem sido associado a redução do risco cardiovascular em longo prazo (29). Na maioria dos pacientes, a terapia inicial de escolha é uma estatina.

As estatinas atuam por pelo menos dois mecanismos em pacientes com dislipidemia. Um deles é a inibição da enzima HMG-CoA redutase (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductase), a enzima limitante na síntese de colesterol no fígado. Desta forma, as estatinas inibem diretamente a biossíntese do colesterol. O outro é a regulação positiva da expressão do receptor de LDL em hepatócitos e, assim, aumento da depuração do colesterol LDL (32).

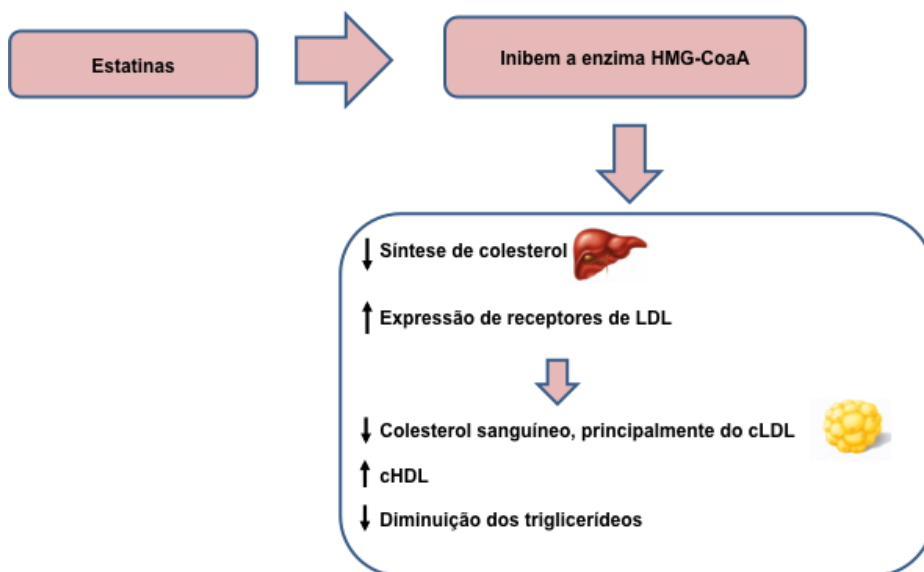


Figura 1- Mecanismos de ação das estatinas. As estatinas inibem a enzima HMG-Coa redutase e, com isso, reduzem a síntese *de novo* de colesterol nos hepatócitos. Estimulam a expressão dos receptores de LDL nos hepatócitos e, finalmente, aumentam a remoção do LDL-C da circulação e reduzem os níveis de triglicérides, devido à diminuição da secreção hepática de VLDL. As estatinas causam aumentos no HDL-C. (32).

As seis estatinas disponíveis para uso clínico são a lovastatina, pravastatina, simvastatina, fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina. Apresentam diferenças entre si, uma delas é a potência (Quadro 2). A potência de uma estatina representa a dose suficiente para diminuir o colesterol em 20% (27, 28).

Quadro 2 - Doses das estatinas e efeitos sobre o LDL-c

Fármaco	Doses	LDL-c
Sinvastatina	20 a 80 mg	- 27% a 42%
Lovastatina	10 a 80 mg	- 21% a 41%
Pravastatina	20 a 40 mg	- 20% a 33%
Fluvastatina	20 a 80 mg	- 15% a 37%
Atorvastatina	10 a 80 mg	-37% a 55%
Rosuvastatina	10 a 40 mg	- 43% a 55%

Fonte: IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (27).

3.2 DIABETES

O diabetes constitui importante problema de saúde pública em diversos países. Em 2014, sua prevalência global foi estimada em 9% entre os adultos com idade acima de 18 anos. Em 2012, foi estimado que 1,5 milhão de mortes foi causado diretamente pelo diabetes, o que colocou a doença como a sétima principal causa de morte, segundo a Organização Mundial da Saúde. O diabetes tem hoje *status* de epidemia, agravado devido ao crescimento e ao envelhecimento populacional, à urbanização, à crescente prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como maior sobrevivência dos pacientes com a doença (33, 34).

O DM é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção da insulina, na ação da insulina ou ambos. A hiperglicemia crônica está associada a danos em longo prazo e disfunção de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos, podendo levar a complicações como retinopatia, insuficiência renal, neuropatia periférica, hipertensão, anormalidades do metabolismo de lipoproteínas, entre outras. Vários processos patogênicos estão envolvidos no desenvolvimento do diabetes, desde destruição auto-imune das células beta do pâncreas com consequente deficiência

absoluta de insulina, até a combinação de graus variados de disfunção secretória da célula beta e resistência à ação da insulina. Os sintomas da hiperglicemia acentuada incluem poliúria, polidipsia, perda de peso, às vezes com polifagia, visão desfocada, prejuízo do crescimento no caso de crianças e suscetibilidade a algumas infecções. A hiperglicemia crônica está, ainda, associada a complicações micro e macrovasculares que determinam o aumento da mortalidade associado à doença (35).

O DM2 é classificado em tipo 1, tipo 2 e outros tipos específicos de diabetes. O diabetes do tipo 1 representa apenas 5 a 10% dos casos e acomete em especial crianças e adolescentes (35). Tradicionalmente, tem como principal característica a destruição auto-imune das células beta pancreáticas, secretoras de insulina (36), que leva a deficiência absoluta de insulina e dependência ao longo da vida da terapêutica com insulina (37). O DM2, forma mais comum da doença e objeto deste estudo, representa 90 a 95% dos casos da doença e apresenta como principais características a resistência à insulina e a disfunção secretória da célula beta pancreática, além de frequentemente ocorrer no contexto da síndrome metabólica (35).

3.2.1 Diabetes Mellitus do Tipo 2

O aumento da frequência da obesidade em todo o mundo tem resultado numa prevalência cada vez maior do DM2 (38). A fisiopatologia do DM2 é complexa, multifatorial e se desenvolve ao longo de período prolongado de tempo, antes do diagnóstico da doença. A resistência à ação da insulina parece ser a alteração mais precoce. Acredita-se que a obesidade leve progressivamente ao aumento da resistência à insulina e das concentrações circulantes de insulina (39). Contribuem para a obesidade, por sua vez, características relacionadas ao estilo de vida e fatores ambientais, incluindo sedentarismo, excesso de consumo de energia, tabagismo, idade elevada, baixo *status* econômico, entre outros (40, 41). Além da resistência à insulina, é observada disfunção secretória progressiva da célula beta pancreática. Quando a secreção de insulina diminuir ao ponto de não ser mais

possível compensar a resistência à ação da insulina, é observada a hiperglicemia que caracteriza a doença (42). A natureza progressiva destas alterações, tanto da resistência à ação da insulina quanto da disfunção secretória da célula beta, se refletem bioquimicamente em estágios intermediários de disglucemia que recebem a denominação de glicemia de jejum alterada e tolerância diminuída à glicose (43, 44).

Os dois componentes fisiopatológicos do DM2, resistência à insulina e defeito da função das células beta pancreáticas, são considerados essenciais na patogênese da doença, e os mecanismos envolvidos em seu desenvolvimento variam consideravelmente em diferentes populações (42). Essas anormalidades são, em grande parte, atribuídas à adiposidade visceral (45), que contribui para diminuição da sensibilidade insulínica e aumento da produção hepática de glicose (46). Os critérios diagnósticos atualmente recomendados pela Associação Americana de Diabetes (*American Diabetes Association, ADA*) foram propostos em 1997 e atualizados em 2003. Posteriormente, foram aceitos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) e estão apresentados no Quadro 3 (47).

Quadro 3 - Valores de glicose plasmática (em mg/dL) para diagnóstico de *diabetes mellitus* e seus estágios pré-clínicos.

CATEGORIA	JEJUM *	2H APÓS 75 G DE GLICOSE	CASUAL**
Glicemia normal	< 100	< 140	
Tolerância à glicose diminuída	> 140 a < 200	≥140 a < 200	
<i>Diabetes Mellitus</i>	≥ 126	≥ 200	≥ 200 ***

* O jejum é definido como a falta de ingestão calórica de no mínimo 8 horas.

** Glicemia plasmática casual é definida como aquela realizada a qualquer hora do dia, sem observar o intervalo da última refeição.

*** Com sintomas clássicos de DM, incluindo poliúria, polidipsia e perda inexplicada de peso.

Fonte: Sociedade Brasileira de Diabetes.

Pacientes com DM2 frequentemente apresentam como comorbidade a dislipidemia relacionada à adiposidade visceral e resistência à insulina e caracterizada por hipertrigliceridemia, HDL baixo e partículas pequenas e densas de LDL (48). A dislipidemia apresenta impacto não apenas sobre o desenvolvimento de aterosclerose mas também sobre a função das células beta pancreáticas, na medida em que, pela redução do HDL e efluxo do colesterol, este se acumula nas células beta, piora a secreção de insulina e induz apoptose das células beta. Desta forma, a homeostase do metabolismo lipídico é importante para a função e sobrevivência das células beta (48).

As alterações do perfil lipídico associadas ao DM2 são atribuídas ao aumento de ácidos graxos livres. A disponibilidade de vários medicamentos hipolipemiantes e suplementos oferece novas oportunidades para que os pacientes alcancem as metas lipídicas recomendadas no diabetes. A prevalência da hipercolesterolemia não é aumentada no DM2, mas a mortalidade por doença cardíaca aumenta exponencialmente em função das concentrações séricas de colesterol total e LDL e o uso de estatinas reduz o risco cardiovascular destes pacientes. Embora a terapia medicamentosa para dislipidemia deve ser individualizada, a maioria diabéticos tipo 2 é candidata à terapia com estatinas e, ocasionalmente, são necessários múltiplos agentes hipolipemiantes para atingir as metas de controle do perfil lipídico (49).

3.3 ESTATINAS E RISCO DE *DIABETES MELLITUS* DO TIPO 2

Uma diversidade de fármacos induz hiperglicemia por uma variedade de mecanismos, incluindo alteração da secreção e sensibilidade insulínicas, efeitos citotóxicos diretos sobre células beta pancreáticas e aumento da produção hepática de glicose (50). A ocorrência de hiperglicemia induzida por fármacos é variável e pode ser observada em horas ou após várias semanas, meses ou até mesmo anos após o início do tratamento (51, 52).

Indivíduos com fatores predisponentes para o desenvolvimento de *diabetes mellitus*, tais como sedentarismo, excesso de peso, glicemia de jejum alterada ou

intolerância à glicose, história familiar de diabetes, história pessoal de doença vascular ou *diabetes mellitus* gestacional, ou pelo menos um critério de síndrome metabólica são considerados de risco para desenvolvimento de hiperglicemia induzida por fármacos (50). Além disso, fármacos com potencial de induzir hiperglicemia apresentam grande potencial de piorar o controle glicêmico de pacientes com diagnóstico prévio de *diabetes mellitus*, por piorar a resistência à insulina pré-existente e/ou a disfunção pancreática (50).

Alterações da homeostase da glicose ocorrem mais frequentemente como efeitos adversos de diuréticos, bloqueadores beta-adrenérgicos, contraceptivos orais, glicocorticóides e alguns agentes imunossupressores (50, 51). Mais recentemente, foi observado que a terapia com estatina está associada com um risco aumentado de desenvolver diabetes (53-56). Dados recentes de um estudo populacional abrangente, que incluiu cerca de 1,2 milhão de participantes, indicaram aumento em 18% do risco de novos casos de diabetes em associação com terapia com estatinas (57). Neste cenário, em fevereiro de 2012 a *Food and Drug Administration* lançou alterações no rótulo de segurança das estatinas para incluir que em associação com sua utilização foi observado aumento da hemoglobina glicada (HbA1c) e da glicemia em jejum (58). A associação entre estatinas e risco de hiperglicemia trouxe o debate a respeito do uso de estatinas em pacientes com fatores de risco cardiovascular como diabetes (59).

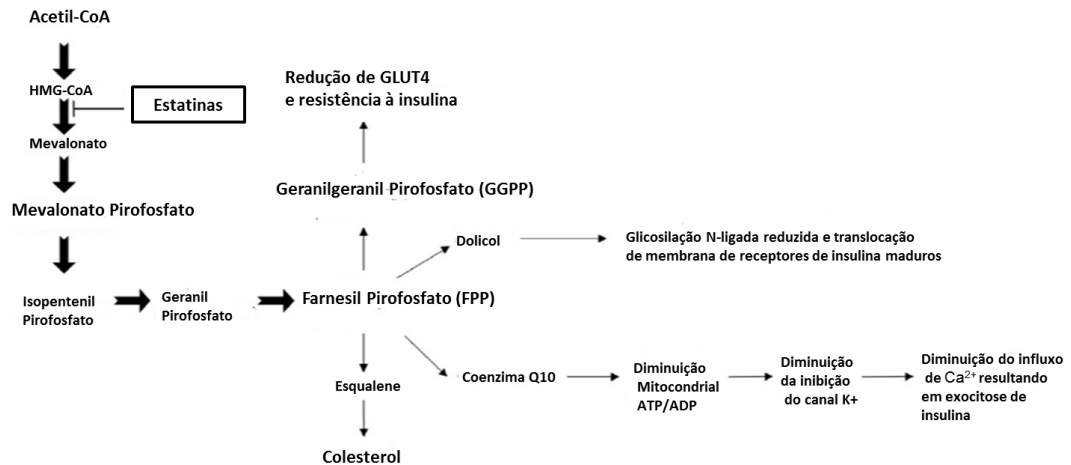
A associação entre estatinas e hiperglicemia parece ser dose-dependente e diferir entre os tipos de estatina (50, 51, 60). Estudo que comparou o controle glicêmico em pacientes diabéticos que receberam atorvastatina (10 mg/d), pravastatina (10 mg/d) ou pitavastatina (2 mg/d) mostrou que apenas o grupo tratado com atorvastatina apresentou elevações da concentração plasmática de glicose e HbA1c (61). Em outro estudo, observou-se que o tratamento com atorvastatina ou simvastatina mas não com pravastatina associou-se com risco aumentado de diabetes (62). O tratamento de pacientes diabéticos com pitavastatina, por sua vez, associou-se a redução da resistência à insulina e prejuízos mínimos ao metabolismo da glicose (63).

Estudos pré-clínicos, envolvendo modelos animais, reforçam que a associação entre as estatinas e o risco de hiperglicemia varia entre as diferentes

estatinas. Brandyn e cols observaram diminuição da captação de glicose no tecido adiposo branco de camundongos submetidos a tratamento com fluvastatina e aumento do risco de hiperglicemia (64). Em outro estudo, foi observado que o tratamento com atorvastatina, em comparação com o controle, resultou em intolerância à glicose e resistência à insulina (65).

Muitos mecanismos têm sido propostos para explicar a associação entre o uso de estatinas e o aumento do risco de diabetes, e é possível que a contribuição individual de cada um destes mecanismos, entre diferentes pacientes, é variável, tal como a contribuição individual dos componentes fisiopatológicos (disfunção das células Beta pancreáticas e resistência à insulina) é variável entre diferentes pacientes (66). Um paradigma hipotético para deterioração do metabolismo da glicose induzida por estatina foi proposto por Sampson e cols. segundo estes autores, evidências experimentais sugerem o envolvimento da inibição dos transportadores de glicose na célula beta, produção retardada de ATP na célula beta, efeitos inflamatórios e pró-oxidantes do colesterol na célula beta, inibição da secreção de insulina dependente de canal de cálcio e apoptose de células Beta (67).

Dados de estudos experimentais indicam que as estatinas (especialmente estatinas lipofílicas) inibem a sinalização do cálcio induzida pela glicose e a secreção de insulina por bloqueio dos canais de cálcio do tipo L nas células beta (15, 68). Além disso, as estatinas reduzem a síntese da coenzima Q 10 (CoQ10), um fator essencial para o sistema de transferência de elétrons mitocondrial. Com isso, inibem a secreção de insulina por redução da produção de ATP (69). A redução da concentração de CoQ10 no músculo esquelético também compromete a função mitocondrial neste tecido e, assim, contribui para a patogênese de resistência à insulina e da redução da tolerância ao exercício (70, 71). Estudos *in vitro* e envolvendo modelos animais, as estatinas inibem a síntese de isoprenóides e, assim, a translocação do GLUT4 para a membrana em adipócitos, o que resulta em redução da captação de glicose por este tecido (65, 72, 73).



Adaptado de Marilynne Brault, 2014.

Figura 2 – Efeito das estatinas na sinalização da insulina. A inibição da via do mevalonato por estatinas causa redução de outros produtos a jusante. Os principais componentes que podem estar envolvidos na instalação do diabetes são GGPP, FPP, dolicol e coenzima Q10. Reduções nos isoprenoides FPP e GGPP resultam na diminuição da captação de GLUT4 e diminuição da atividade de Ras. A redução do dolicol resulta em redução da expressão do receptor de insulina de membrana. CoQ10 é necessária para produzir ATP mitocondrial para estimular a secreção de insulina, via influxo de cálcio nas células β . ADP, difosfato de adenosina; ATP, trifosfato de adenosina; Ca^{2+} , íons de cálcio; CoQ10, coenzima Q10; FPP, farnesil pirofosfato; GGPP, geranylgeranyl pirofosfato; GLUT4, transportador de glicose 4; IR, insulina receptor; K^+ , íons de potássio (73).

3.4 MICROBIOTA INTESTINAL

Nas últimas décadas, a maioria das pesquisas sobre o impacto das bactérias no ambiente intestinal tem incidido sobre sua associação com doenças e os mecanismos envolvidos nesta associação (74). O cólon humano abriga um vasto conjunto de microrganismos envolvidos em processos vitais na fisiologia e nutrição do ser humano, e estes microrganismos definidos como a microbiota intestinal (75).

No intestino adulto, um total de cerca de 10^{14} células bacterianas estão presentes, um número dez vezes superior ao de células humanas em um organismo (76). O genoma combinado destes microrganismos (conhecido como o microbioma) contém mais de 5 milhões de genes (77), o que se reflete em elevada capacidade metabólica. De fato, a capacidade metabólica da microbiota intestinal é igual à do fígado e a microbiota intestinal pode, por conseguinte, ser considerada como órgão adicional nos humanos (78).

Algumas bactérias da microbiota do intestino humano são capazes de invadir a barreira da mucosa ou translocar-se para compartimentos internos do corpo e determinar infecções locais e sistêmicas. Outras bactérias estão associadas com a formação de toxinas e induzem doenças quando se tornam dominantes. A maioria destes agentes patogênicos potenciais foi isolada em cultura e reconhecida por técnicas tradicionais de diagnóstico microbiológico. No entanto, a grande maioria das bactérias do intestino humano não foi cultivada em meio de cultura padrão e o seu potencial papel na saúde ou doença é desconhecido. A capacidade de cultivo de certos filotipos parece estar relacionada com a sua abundância relativa (79).

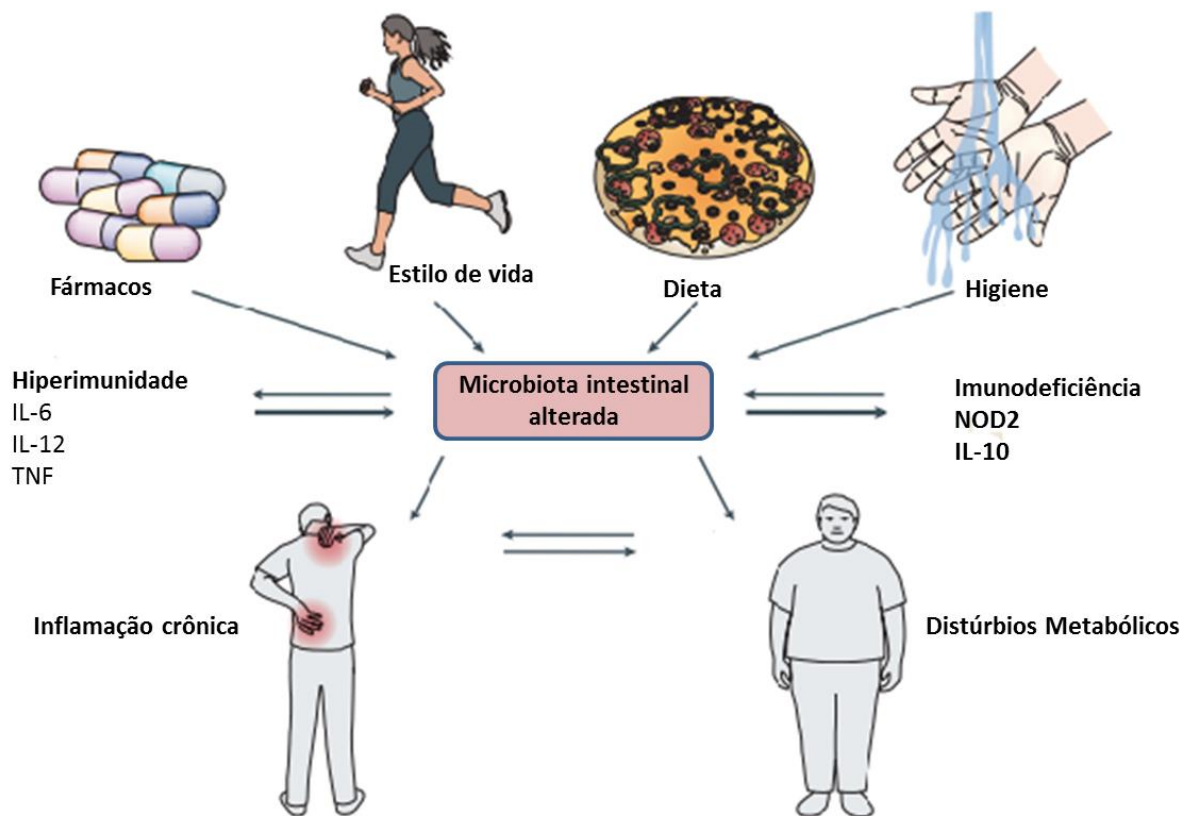
O conceito de relação simbiótica hospedeiro-microrganismo no intestino, em termos de benefícios comprovados ou mutualismo entre parceiros, se baseia principalmente em estudos realizados com camundongos isentos de germes (*germ-free*) (80). Tais estudos demonstraram importantes diferenças na anatomia e fisiologia de animais isentos de germes em comparação com animais colonizados e, curiosamente, a reconstituição de animais isentos de germes com a microbiota de animais colonizados por implantes de fezes, reverte a maioria destas diferenças (75). Estes dados indicaram que a colonização microbiana tem impactos importantes e específicos sobre o crescimento e desenvolvimento, bem como sobre a manutenção da saúde durante a vida adulta. As principais funções da microbiota intestinal são de três naturezas, metabólica, protetora e trófica (81), e incluem defesa contra agentes patogênicos, imunidade, desenvolvimento das microvilosidades intestinais, degradação dos polissacarídeos não digeríveis, entre outras (82, 83).

Como mencionado anteriormente, grande proporção das bactérias que vivem no intestino humano não pode ser isolada e caracterizada por meio de métodos tradicionais de cultura (81). Técnicas de biologia molecular, mais sensíveis e precisas na identificação, baseiam-se nas diferenças de sequência de nucleotídeos dos genes microbianos. A maioria destas técnicas consiste na extração de DNA a partir de amostra fecal ou da mucosa intestinal, seguida de amplificação e seqüenciamento do gene que codifica o RNA 16S ribossomal bacteriano, que contém regiões conservadas e variáveis que permitem sua identificação taxonômica desde o domínio e filo até o nível da espécie. Atualmente, cerca de dois milhões de

sequências do gene que codifica o RNA ribossômico 16S estão disponíveis em bases de dados de DNA (84). A identificação taxonômica é realizada com base na análise de similaridade de sequência do gene que codifica o RNA ribossômico 16S com sequências de referência na referida base. Desta maneira, estudos sobre o gene do RNA ribossômico 16S fornecem informações sobre a composição microbiana e a diversidade das espécies em uma determinada amostra. O desenvolvimento mais recente da análise do microbiota intestinal é a chamada "metagenômica", que representa o estudo de todo o material genético recuperado diretamente a partir de amostras ambientais, sem a necessidade de isolar e cultivar membros individuais da comunidade de bactérias (85, 86). O metagenoma é o conteúdo genético coletivo dos genomas dos constituintes de uma comunidade ecológica (87).

A abordagem metagenômica tem a vantagem de não apenas fornecer a caracterização filogenética da comunidade microbiana, mas também de informar sobre funções biológicas da comunidade (88). Os estudos moleculares com base no sequenciamento do gene que codifica o RNA ribossômico 16S têm destacado que apenas sete a nove das cinquenta e cinco divisões conhecidas ou filos das bactérias são detectadas em amostras de fezes ou das mucosas do intestino do ser humano (85, 87, 89). Além disso, estes estudos também revelaram que mais de 90% de todas as sequências filotipos (com 97% de identidade que representam uma única espécie) pertencem a apenas duas divisões: *Bacteroidetes* (Gram-negativos) e a Firmicutes (Gram-positivos). Firmicutes são encontradas em maior proporção (60%), com mais de 200 gêneros, os mais importantes firmicutes são: *Mycoplasma*, *Bacillus* e *Clostridium*. Os *Bacteroidetes* representam cerca de 10% da microbiota intestinal, com o restante pertencente a mais de 10 famílias de minorias. No total, há mais de 1000 espécies diferentes no intestino (90, 91). As outras divisões que têm sido consistentemente encontradas em amostras do intestino distal humano são *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia*. Assim, no nível de divisão, o ecossistema intestinal humano é menos diversificado do que outros ecossistemas da Terra, como os solos e as águas do oceano, que podem conter vinte ou mais divisões de bactérias (92).

Há considerável variação na composição da microbiota intestinal entre indivíduos humanos e grande proporção dos filotipos identificados são exclusivos para cada pessoa (92). Cada indivíduo abriga seu próprio padrão de composição bacteriana, que varia de acordo com a dieta, estilo de vida e uso de medicamentos (Figura 3) (93, 94). Estudos recentes mostram que alguns medicamentos, como os antibióticos, apresentam impacto considerável sobre as comunidades bacterianas no trato digestivo. Estes fármacos podem alterar características taxonômicas, genômicas e funcionais da microbiota intestinal humana, com efeitos rápidos e, por vezes, persistentes. Antibióticos de amplo espectro reduzem a diversidade bacteriana (95).



Adaptado de Felix Sommer, 2013

Figura 3 – Fatores que influenciam a composição da microbiota intestinal e os efeitos da disbiose sobre a saúde do hospedeiro. A composição da microbiota intestinal é influenciada por vários fatores ambientais, incluindo a utilização de antibióticos, estilo de vida, preferências alimentares e fatores relacionados à higiene. Fatores genéticos do hospedeiro também influenciam a composição da microbiota intestinal. Outro fator que pode influenciar sua composição é a hiperimunidade, devido à produção aumentada de mediadores como interleucina-6, interleucina-12 ou fator de necrose tumoral, ou estados de imunodeficiências. A disbiose intestinal, por sua vez, influencia a produção de mediadores imunológicos e induz inflamação crônica e disfunção metabólica (94).

3.4.1 Microbiota intestinal, obesidade e diabetes

A composição da microbiota intestinal tem sido associada com várias características da síndrome metabólica, incluindo obesidade, *DM2*, doenças cardiovasculares e doença hepática gordurosa não alcoólica. Evidências crescentes sugerem que microrganismos presentes no intestino contribuem para o aparecimento da inflamação de baixo grau que caracteriza estes distúrbios metabólicos (96).

Vários estudos sugeriram que a microbiota intestinal exerce papel crucial no desenvolvimento da adiposidade visceral e alteração da homeostase energética. A mais antiga evidência apoiando esta hipótese é a de um estudo que revelou que ratos isentos de germes (criados na ausência de quaisquer microrganismos) são mais magros quando comparados com aqueles que abrigavam microbiota desde o nascimento. Foi observado, também, que a colonização do intestino de ratos isentos de germes com microbiota intestinal convencional induz a aumento da massa adiposa e resistência à insulina. Este estudo revelou que a microbiota do intestino é um fator ambiental que regula o armazenamento de gordura e que ratos isentos de germes são protegidos contra a obesidade (97, 98).

Um dos mecanismos propostos para explicar o aumento da adiposidade em animais colonizados com a microbiota, em comparação com os isentos de germes, é que a microbiota intestinal tem a capacidade de aumentar o armazenamento de energia a partir da dieta (99). Além disso, sua capacidade de modular vias de sinalização relacionadas à homeostase energética do hospedeiro poderia influenciar o balanço energético (97-100). Já foi demonstrado também que a microbiota intestinal desempenha papel importante no aparecimento de resistência à insulina e *DM2* possivelmente por determinar inflamação de baixo grau (98, 101). Embora não incluída na definição de síndrome metabólica, a inflamação de baixo grau é uma característica comum à obesidade e vários distúrbios metabólicos.

Os mecanismos envolvidos na associação entre a microbiota intestinal e o desenvolvimento da inflamação de baixo grau, no entanto, não foram completamente definidos (96). Foi observado que a microbiota intestinal alterada na

obesidade aumenta a secreção de endotoxinas e modula a permeabilidade intestinal, o que pode levar à inflamação crônica de baixo nível e, conseqüentemente, à resistência à insulina e aparecimento do DM2 (96, 102). Outros grupos de pesquisa também observaram que o acúmulo de moléculas derivadas de bactérias intestinais (por exemplo, LPS, peptidoglicanos e flagelina) no intestino acelera a inflamação relacionada ao DM2 (103, 104). Foi proposto, também, que a microbiota intestinal aumenta a absorção intestinal de monossacarídeos, fazendo com que o hospedeiro aumente a produção hepática de triglicérides e isto se associa com o desenvolvimento de resistência à insulina (105).

Evidências crescentes apoiam a ideia de que o aumento da prevalência de obesidade e DM2 não pode ser atribuída apenas a fatores genéticos, hábitos nutricionais ou ao sedentarismo (106). São crescentes os dados que indicam o papel de alterações da composição da microbiota intestinal (isto é, mudanças na abundância ao nível dos filos, gênero ou espécie) na fisiopatologia da obesidade (99, 107). O primeiro estudo que mostrou esta associação foi realizado em modelo genético de obesidade em camundongos (animais com deleção homocigota do gene que codifica a leptina, *ob/ob*) e revelou aumento da proporção de Firmicutes e diminuição da de Bacteroidetes, que são os 2 filos dominantes da microbiota intestinal (99, 107). Estudos posteriores, em outros modelos murinos de obesidade, confirmaram esta alteração da proporção entre Firmicutes e Bacteroidetes na microbiota intestinal de animais obesos, quando comparados a animais não obesos (100, 108-110).

Nos humanos, a mesma alteração da abundância dos principais filos de bactérias é observada no contexto da obesidade e DM2, sendo que o aumento de Firmicutes e diminuição de Bacteroidetes em pacientes obesos continua a ser uma questão de debate (97, 107, 111-117). É observado também aumento da abundância relativa de vários agentes patogênicos oportunistas e de algumas bactérias Gram-negativas produtoras de endotoxinas (112, 113, 118). Estudos em seres humanos também revelaram que a abundância relativa de *Bifidobacterium* parece ser menor em pacientes diabéticos com sobrepeso ou obesos do que em indivíduos magros (113, 114). Em modelos animais, o aumento dos níveis de

Bifidobacterium em camundongos tratados com prebióticos está significativa e positivamente correlacionado com a melhora da tolerância à glicose e da inflamação de baixo grau (101, 119).

Modificações da composição da microbiota intestinal já foram implicadas também na redução do peso corporal e melhora de variáveis metabólicas. Em um estudo envolvendo modelo murino de cirurgia bariátrica, foi observado que a redução do peso e melhora do controle glicêmico em resposta à intervenção em questão associou-se a modificação do perfil da microbiota intestinal (120). Observou-se, além disso, que algumas cepas probióticas foram capazes de modular positivamente a homeostase da glicose e, conseqüentemente, melhorar o controle do DM2 (121).

Os antibióticos apresentam uma dinâmica interessante no relacionamento microbioma-hospedeiro. Embora os antibióticos sejam bem conhecidos por causarem alterações na microbiota intestinal em curto e longo prazos (122-127), há uma falta de consenso sobre seus efeitos na tolerância à glicose, peso corporal e outros parâmetros metabólicos (128). Além disso, os efeitos de antibióticos em camundongos magros e normoglicêmicos em comparação com modelos de obesidade em camundongos não foram amplamente investigados. Um estudo de intervenção em humanos, tolerantes à glicose e saudáveis, tratados com coquetel de antibióticos de amplo espectro por 4 dias, mostrou mudanças na microbiota intestinal, mas nenhuma alteração na glicose plasmática pós-prandial e na insulina sérica (129). Entender as interações microbiota-antibiótico e seus efeitos sobre o peso e metabolismo da glicose em mamíferos saudáveis é fundamental para identificar mudanças iniciais na microbiota que podem levar a doenças como obesidade e diabetes (130).

Nesse contexto, foi observado recentemente que o tratamento de camundongos com antibióticos por 4 semanas, antes da obesidade induzida por dieta, reduz a abundância absoluta da microbiota intestinal e depleta Firmicutes e Bacteroidetes no intestino de camundongos e que essa redução proeminente na abundância de Firmicutes e Bacteroidetes pelo tratamento antibiótico melhora a resistência à insulina induzida pela dieta, além disso, a abundância absoluta de DNA bacteriano em camundongos em tratamento com antibióticos foi significativamente

reduzida em relação ao grupo controle, sugerindo que a riqueza absoluta da microbiota intestinal é alterada por antibióticos (131).

No entanto, o tratamento de camundongos isentos de germes com antibióticos, bem como a colonização de camundongos livres de germes com microbiota modificada com antibiótico, são necessários para apoiar totalmente os estudos acima. Além disso, é duvidoso que antibióticos diferentes usem os mesmos mecanismos de expressão gênica e alterações na microbiota para afetar a tolerância sistêmica à glicose (130).

A bactéria intestinal anaeróbica *Akkermansia muciniphila* é um membro bem caracterizado da microbiota da mucosa intestinal em seres humanos. *A. muciniphila* tem sido associada negativamente com a obesidade e seus distúrbios metabólicos associados. Em um estudo recente em modelo animal foi observado que o tratamento com células de *A. muciniphila* reverte a obesidade induzida por dieta com alto teor de gordura e seus distúrbios metabólicos associados (132). Um outro estudo observou que camundongos obesos e com diabetes tipo 2 apresentaram uma abundância diminuída de *Akkermansia* e que o tratamento com *A. muciniphila* reverteu completamente a hiperglicemia de jejum induzida por dieta e a resistência à insulina, reduziu o peso corporal e a massa de gordura total demonstrando que essa bactéria controla o armazenamento de gordura, o metabolismo do tecido adiposo e a homeostase da glicose (133).

Vale ressaltar também que NR Shin. e cols observaram que o tratamento com metformina melhorou significativamente o perfil glicêmico de camundongos alimentados com dieta rica em gordura (HFD). Os camundongos alimentados com HFD tratados com metformina mostraram uma abundância maior da bactéria *Akkermansia* do que os alimentados apenas com HFD e a administração oral de *Akkermansia muciniphila* a camundongos alimentados com HFD sem metformina aumentou significativamente a tolerância à glicose e atenuou a inflamação do tecido adiposo (134). Esses dados, em conjunto, sugerem fortemente que a microbiota intestinal desempenha papel importante na regulação do balanço energético e do peso em animais e seres humanos, e que pode influenciar o desenvolvimento e a progressão da obesidade e outros distúrbios metabólicos, incluindo o DM2. Dessa forma, a manipulação da microbiota intestinal representa uma abordagem potencial

para o tratamento da obesidade, diabetes e demais distúrbios metabólicos. No entanto, uma série de investigações devem ser realizadas a fim de alavancar a manipulação da microbiota intestinal para fins terapêuticos (135).

3.4.2 Estatinas e microbiota intestinal

A capacidade das estatinas modificarem a composição da microbiota intestinal foi muito pouco explorada. Em um estudo recente, foi observado que as estatinas alteram os metabólitos do microbioma entérico. Observou-se que o aumento da concentração de sinvastatina no plasma correlaciona-se positivamente com níveis mais elevados de vários ácidos biliares produzidos por bactérias entéricas, mostrando uma possível alteração da microbiota intestinal pelas estatinas (136).

E, mais recentemente, foi demonstrado que a terapia com estatinas levou a mudanças na composição da microbiota intestinal, em camundongos tratados durante 12 semanas com pravastatina, atorvastatina ou sem tratamento (veículo), em combinação com uma dieta normal ou uma dieta rica em gordura (HFD). Essas mudanças afetaram a diversidade e o perfil metabólico da microbiota intestinal, a população dos filos Firmicutes e Bacteroidetes foi diminuída com o tratamento com as estatinas e também foi associada à produção reduzida de butirato, essa produção prejudicada de ácido butírico, indica disbiose funcional uma vez que o papel conhecido dos ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), em regular a função da barreira intestinal, os lipídios, glicose e metabolismo do colesterol e as mudanças no perfil dos SCFA podem impactar a fisiologia do hospedeiro e contribuir para o desenvolvimento do fenótipo de DM2 (137).

Foi observado, também, que a administração de rosuvastatina para camundongos afetou a microbiota gastrointestinal, influenciou o metabolismo do ácido biliar e alterou a transcrição de genes que codificam fatores envolvidos na homeostase intestinal e imunidade no trato gastrointestinal (138).

Entretanto, embora plausível, a relação entre estas modificações, o risco de alterações da homeostase da glicose associado a algumas estatinas e a microbiota intestinal não foi explorado, para nosso conhecimento.

Portanto o objetivo deste trabalho foi determinar se os efeitos das estatinas sobre a homeostase da glicose podem ser influenciados por modulação da microbiota intestinal em camundongos diabéticos ob/ob, como forma de investigar a associação entre a microbiota intestinal e as alterações glicêmicas induzidas pelas estatinas. Os resultados assim obtidos poderiam identificar novos mecanismos implicados na hiperglicemia induzida pelas estatinas e, assim, potencialmente fundamentar o desenvolvimento de estratégias preventivas desta alteração em condição de obesidade.

4 MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi realizado em camundongos machos *ob/ob* e os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos). O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília, com Unb-Doc 135663/2015 (Anexo I).

Ao final do estudo, a eutanásia foi realizada de acordo com a Diretriz do CONCEA (Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA) e do Conselho Federal de Medicina Veterinária (Guia Brasileira para Boas Prática para Eutanásia em Animais). Após eutanásia as carcaças dos animais foram descartadas seguindo as normas para este tipo de resíduo, Lei Nacional de Resíduos Sólidos Nº 12.305/2010.

4.2 MODELO ANIMAL

No presente estudo foram utilizados camundongos *ob/ob* machos (espécie *Mus musculus*, Ordem *Rodentia*, Família *Muridae*, cepa C57Bl/6J), isogênicos, obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia, da Universidade Federal de São Paulo – CEDEME. Os camundongos foram mantidos em gaiolas apropriadas, individualizados, em ambiente com temperatura controlada (25° C) e ciclo claro/escuro a cada 12 horas (escuro entre 18:00 h e 6:00 h).

O camundongo *ob/ob* representa um modelo monogênico de obesidade, resultante de mutação autossômica recessiva no gene que codifica a leptina (Lep^{ob}), localizado no cromossomo 6. Este camundongo ($Lep-Ob^{-/-}$) apresenta deficiência da leptina e, fenotipicamente, obesidade, hiperlipidemia, resistência à insulina, hiperglicemia e inflamação do tecido adiposo, todas características típicas do DM2 obeso, sendo ótimo modelo de estudo para obesidade e DM2. Desta forma, estes animais constituem um bom modelo experimental para investigar o efeito de

intervenções sobre variáveis metabólicas, como as pretendidas no projeto exposto (The Jackson Laboratories).

4.3 DIETA

Os camundongos foram alimentados com dieta controle (10% do total de kcal proveniente de lipídeos), obtida da empresa Pragsoluções (São Paulo, Brasil). A dieta foi fornecida na forma de *pellet* e o acesso a ela e a água (filtrada) foi *ad libitum*. O consumo de ração foi avaliado a cada 3 dias da semana.

Tabela 1 - Descrição dos componentes da dieta padrão.

Dieta controle		
AIN-93G		
	g (%)	kcal (%)
Proteína	19,2	20
Carboidrato	67,3	70
Lipídeo	4,3	10
Total		100
(kcal/g)	3,85	

Ingrediente	g	kcal
Caseína	200	800
L-cistina	3	12
Amido de milho	315	1260
Maltodextrina	35	140
Sacarose	350	1400
Celulose	50	0
Oleo de soja	25	225
Lard	20	180
Mistura mineral S10026	10	0
Fosfato dicálcico	13	0
Carbonato de Cálcio	5,5	0
Citrato de potássio	16,5	0
Mistura de vitamina V10001	10	40
Bitartrato de colina	2	0
Corante Amarelo	0,05	0
Total	1055,05	4057

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Entre a 13^a a 21^a semana de vida, os animais foram aleatoriamente divididos em grupos com ou sem adição de atorvastatina ou pravastatina à dieta padrão (para fornecer a dose de 80 mg/kg/dia). As estatinas foram enviadas à empresa Prag Soluções, que as misturou aos outros componentes da dieta padrão. A dieta com estatina foi usada com o objetivo de reduzir o colesterol e induzir a hiperglicemia e foram fornecidas na forma de *pellet* e o acesso a elas e a água (filtrada) foi *ad libitum*.

Neste estudo, foram utilizados 30 camundongos, aleatoriamente divididos em 3 grupos contendo 10 animais cada. O primeiro grupo (G1) recebeu dieta controle, o segundo grupo (G2) dieta controle acrescida de atorvastatina (80 mg/kg/d) a partir da 13^a semana de vida, e o terceiro (G3), dieta controle acrescida de pravastatina (80 mg/kg/d) a partir da 13^a semana de vida. A partir da 17^a semana de vida, cada um dos grupos foi subdividido em dois grupos, um para manter o tratamento anterior e outro para receber, além do tratamento anterior, os antibióticos ciprofloxacina e vancomicina (0,2 g/L e 0,5 g/L). Desta forma, o estudo foi composto por 6 grupos experimentais, cada um com 5 animais, descritos da seguinte forma:

- (1) Animais que receberam dieta padrão controle.
- (2) Animais que receberam dieta padrão e antibióticos.
- (3) Animais que receberam dieta padrão e atorvastatina.
- (4) Animais que receberam dieta padrão, atorvastatina e antibiótico.
- (5) Animais que receberam dieta padrão e pravastatina.
- (6) Animais que receberam dieta padrão, pravastatina e antibiótico.

As estatinas, atorvastatina e pravastatina, foram administradas durante 8 semanas (da 13^a à 21^a semanas de vida) na dieta, ambas nas doses de 80 mg/kg/dia. Os antibióticos ciprofloxacina e vancomicina foram administrados na água

de beber nas concentrações de 0,2 g/L e 0,5 g/L, respectivamente, durante 4 semanas (da 17^a à 21^a semanas de vida). As estatinas foram obtidas da empresa Sigma e sua dose e período de administração estão em conformidade com estudos prévios envolvendo camundongos C57Bl/6J (139, 140). Os antibióticos foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich®, e a dose e período de sua administração estão em conformidade com estudos prévios envolvendo camundongos C57Bl/6J (141). A administração dos antibióticos tem como objetivo erradicar a microbiota intestinal e, assim, avaliar se o efeito das estatinas sobre a homeostase da glicose é influenciado pela microbiota.

O peso, ingestão de dieta e ingestão hídrica foram avaliados semanalmente, até a 21^a semana de vida. Entre a 12^a e a 21^a semanas de vida, estas variáveis foram avaliadas três vezes por semana.

Amostras de fezes foram coletadas manualmente direto do ânus de cada animal, semanalmente, e armazenadas a -80°C, para posterior determinação da composição da microbiota intestinal. Para tanto o DNA fecal foi extraído por meio de *Kits* apropriados, submetido à amplificação, por reação em cadeia da polimerase (PCR), de fragmento do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico. O produto de amplificação foi submetido a avaliação para determinação da composição da microbiota fecal.

A glicose capilar foi avaliada a partir da 12^a semana de vida, e a cada duas semanas, foram coletadas amostras de sangue (5 uL), para determinação da glicemia .

Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados por decaptação, seguindo as Diretrizes sugeridas pelo Guia Brasileiro de Boas Práticas para a Eutanásia em Animais (CFMV - 2013) e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA (Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA - 2013). Foram coletados o tecido adiposo marrom interescapular, tecido adiposo branco subcutâneo (inguinal), tecido adiposo branco visceral (epididimal, retroperitoneal) fígado, coração, e foram armazenados a -80°C para avaliações posteriores.

O delineamento experimental está esquematizado na figura a seguir:

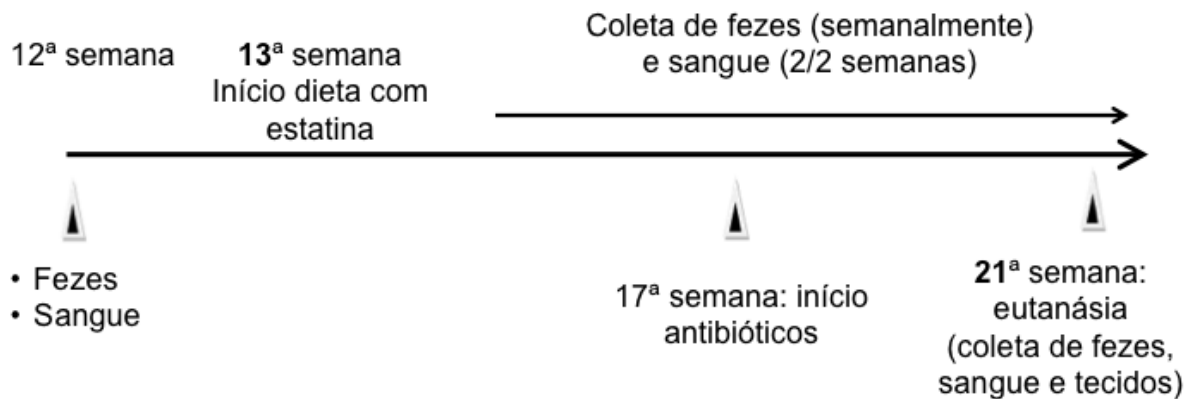


Figura 4 - Delineamento experimental. Camundongos *ob/ob* machos foram tratados com atorvastatina ou pravastatina, acrescentadas à dieta, da 13ª a 21ª semanas de vida, e submetidos a coleta de sangue (a cada 2 semanas) e fezes (semanalmente). Da 17ª semana ao final da 21ª semana de vida, 3 grupos de animais receberam, adicionalmente, tratamento com antibióticos na água de beber, para promover a depleção da microbiota intestinal. Ao final da 21ª semana de vida, os animais foram eutanasiados e foram coletados fezes, sangue e tecidos para posterior avaliações.

4.5 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

Para avaliação da glicemia foi retirada amostra de sangue da veia caudal e utilizada a fita Accu chek performa.

A concentração sérica de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol total (CT), triglicerídeos, LDL colesterol foi analisada por método enzimático utilizando kits de ensaio (OSR6009, OSR6107, OSR6116, OSR60118, respectivamente), de acordo com as instruções do fabricante, no sistema Beckman Coulter AU680 analisador químico automático (Beckman Coulter, Inc., Brea, USA).

A insulina foi dosada utilizando o kit de elisa (EMD Millipore, Missouri; USA)

4.6 ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL

4.6.1 Extração de DNA de amostras de fezes e análise de sequenciamento de RNA 16S

As amostras de fezes (60 mg) foram pesadas em um tubo de microcentrífuga estéril para isolamento do DNA. A extração de DNA foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (QIAGEN, Hilden, Alemanha) com as seguintes modificações: 60 mg de amostra fecal foram misturados com 1,4 mL de tampão de ASL em um tubo de 2 mL e submetidos a vortex até a amostra ser completamente homogeneizada. Finalmente, o DNA foi extraído de acordo com as instruções do kit de DNA QIAamp MiniKit e eluído em 100 µL de tampão de eluição fornecido no kit. A concentração de DNA e a qualidade de todas as amostras foram verificadas por um espectrofotômetro NanoDrop 2000 / 2000c (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, EUA). A integridade do DNA foi verificada pela verificação da intensidade de coloração das bandas após a eletroforese em gel de agarose.

A presença de bactérias específicas nas amostras fecais foi avaliada por qPCR. Resumidamente, os números de cópias de 16SrRNA (bactérias totais), Firmicutes, Bacteroidetes, *Lactobacillus spp* e *Akkermansia muciniphila*, por ng de DNA fecal, foram calculados com base nos valores de Ct obtidos usando curvas padrão projetadas para cada táxon. O número de cópias de cada táxon foi então normalizado pelo total de bactérias. Os primers in silico foram projetados e testados pela análise Primer-BLAST (Tabela 2).

Tabela 2 - Sequências de primers utilizadas para análise bacteriana por PCR em tempo real.

Alvo	<i>Primer forward</i>	<i>Primer reverse</i>
16SrRNA	TGGAGCATGTGGTTTAATTCGA	TGCGGGACTTAACCCAACA
Bacteroidetes	GGTAAGGTTCTCGCGTA	CCGGAWTYATTGGGTTAAAGGG
Firmicutes	ACACYTAGYACTCATCGTTT	CTGATGGAGCAACGCCGCGT
<i>Lactobacillus</i> <i>spp</i>	TGGAAACAGRTGCTAATACCG	GTCCATTGTGGAAGATTCCC
<i>Akkermansia</i> <i>muciniphila</i>	CAGCACGTGAAGGTGGGGAC	CCTGCGGTTGGCTTCAGAT

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

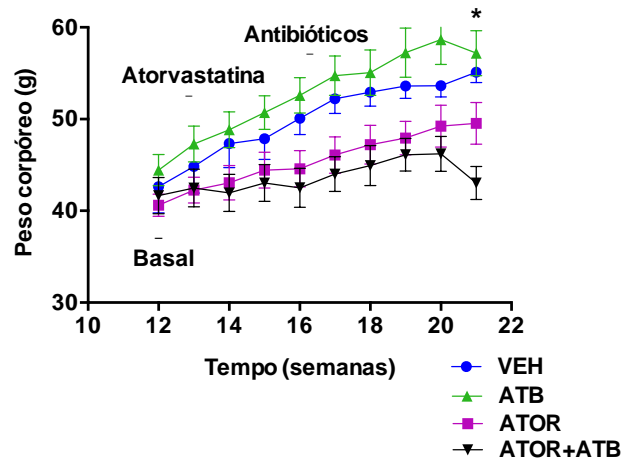
Os dados foram analisados no programa estatístico *Graph Pad Prism 5.0*. Todos os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). A análise de variância de um fator (one way ANOVA), foi usado para comparar as médias entre dois ou múltiplos grupos, respectivamente. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM ATORVASTATINA E PRAVASTATINA SOBRE O PESO CORPORAL, INGESTÃO DE DIETA E INGESTÃO HÍDRICA

Como pode ser observado nas figuras 5A e 5C, na 12^a semana de idade, antes do tratamento com estatinas, os animais alocados para diferentes grupos não apresentaram diferenças de peso. Após 8 semanas de tratamento com ATOR (80 mg/kg/dia), os camundongos apresentaram peso corporal reduzido quando comparados com o grupo que recebeu veículo. O tratamento com antibiótico, isoladamente, não alterou o peso, mas o co-tratamento com ATOR e antibióticos aumentou significativamente a redução de peso (Figura 5A). Ao contrário da ATOR, o tratamento com PRAVA (80 mg/kg/dia), durante 8 semanas, isoladamente ou em combinação com antibióticos nas últimas 4 semanas, não alterou significativamente peso corporal (Figuras 5B).

A



B

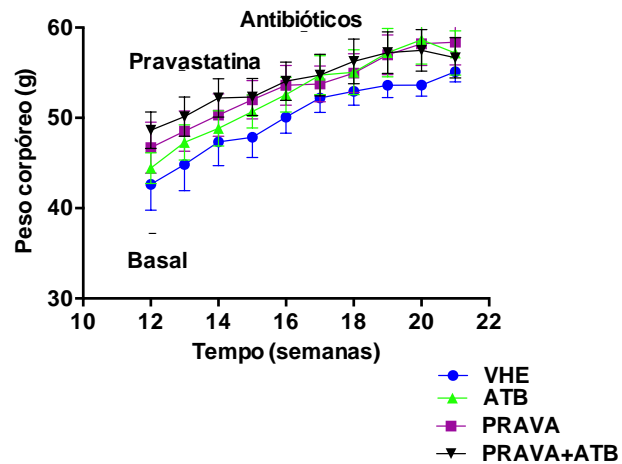


Figura 5 - Efeitos da atorvastatina e da pravastatina no peso corporal de camundongos *ob/ob* machos, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos. Os camundongos foram alimentados com dieta controle ou dieta suplementada com atorvastatina (80 mg/kg/dia) ou pravastatina (80 mg/kg/dia) da 13^a até a 21^a semanas de vida, na ausência ou presença de antibióticos (ciprofloxacina 0,2 g/L e vancomicina 0,2 g/L), na água de beber, da 17^a à 21^a semana. Dados apresentados como média \pm EPM. (A, B) Peso corporal; * $p < 0.05$ grupo atorvastatina+atb vs. grupo veículo. One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-keuls; $n = 5$ camundongos por grupo. ATB: antibióticos; ATOR: atorvastatina; PRAVA: pravastatina.

Não foi observada diferença entre os grupos com relação ao consumo médio diário de dieta (Figuras 6 A e 6 B) entre os diferentes grupos analisados da 12^a à 21^a semanas de vida.

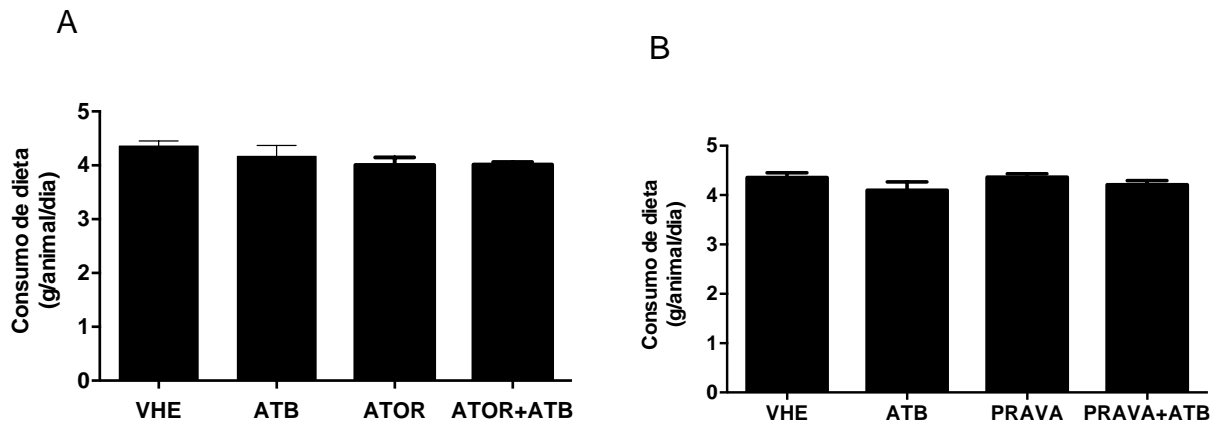


Figura 6 - Efeitos da atorvastatina e da pravastatina no consumo de dieta de camundongos *ob/ob* machos, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos. Os camundongos foram alimentados com dieta controle ou dieta suplementada com atorvastatina (80 mg/kg/dia) ou pravastatina (80 mg/kg/dia) da 13^a até a 21^a semanas de vida, na ausência ou presença de antibióticos (ciprofloxacina 0,2 g/L e vancomicina 0,2 g/L), na água de beber, da 17^a à 21^a semana. Dados apresentados como média \pm EPM. (A, B) Consumo de dieta. One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-keuls; n = 5 camundongos por grupo. ATB: antibióticos; ATOR: atorvastatina; PRAVA: pravastatina.

Conforme (Figuras 7A e 7B) não foi observada diferença entre os grupos com relação à ingestão hídrica média diária entre os diferentes grupos analisados da 12^a à 21^a semanas de vida

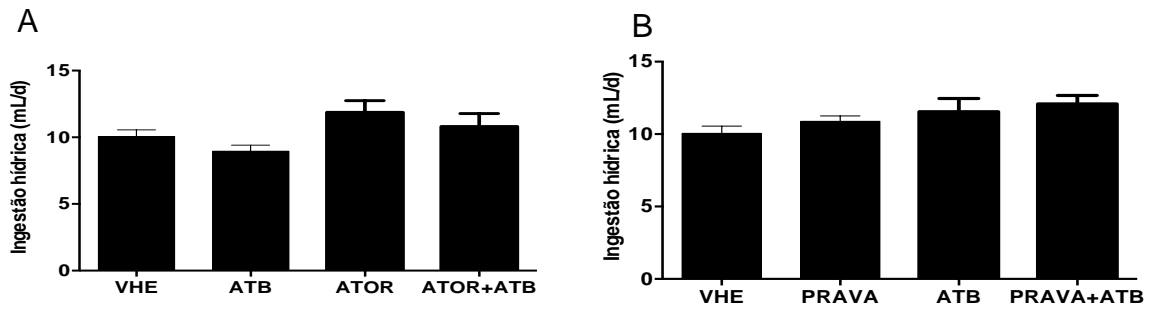


Figura 7 - Efeitos da atorvastatina e da pravastatina na ingestão hídrica média de camundongos *ob/ob*, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos. Os camundongos foram alimentados com dieta controle ou dieta suplementada com atorvastatina (80 mg/kg/dia) ou pravastatina (80 mg/kg/dia) da 13^a até a 21^a semanas de vida, na ausência ou presença de antibióticos (ciprofloxacina 0,2 g/L e vancomicina 0,2 g/L), na água de beber, da 17^a à 21^a semana. Dados apresentados como média \pm EPM. (A, B) Ingestão hídrica. One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-keuls; n = 5 camundongos por grupo. ATB: antibióticos; ATOR: atorvastatina; PRAVA: pravastatina.

5.2 EFEITO DA ATORVASTATINA E PRAVASTATINA, SOBRE A ADIPOSIDADE, MASSA DO CORAÇÃO E DO FÍGADO

Após 8 semanas de tratamento com ATOR (80 mg/kg/dia), os camundongos além de apresentarem peso corporal reduzido, também foi reduzida a massa adiposa visceral (TABv) no grupo com co-tratamento com antibióticos, mas não alterou a massa adiposa subcutânea (TABs) quando comparados com o controle (Figuras 8A e 8C). Ao contrário da ATOR, o tratamento dos animais com PRAVA (80 mg / kg / dia) durante 8 semanas, isoladamente ou em combinação com antibióticos nas últimas 4 semanas, não alterou significativamente o peso corporal e não houve diferenças no tecido adiposo branco e visceral neste grupo. (Figuras 8B e 8D)

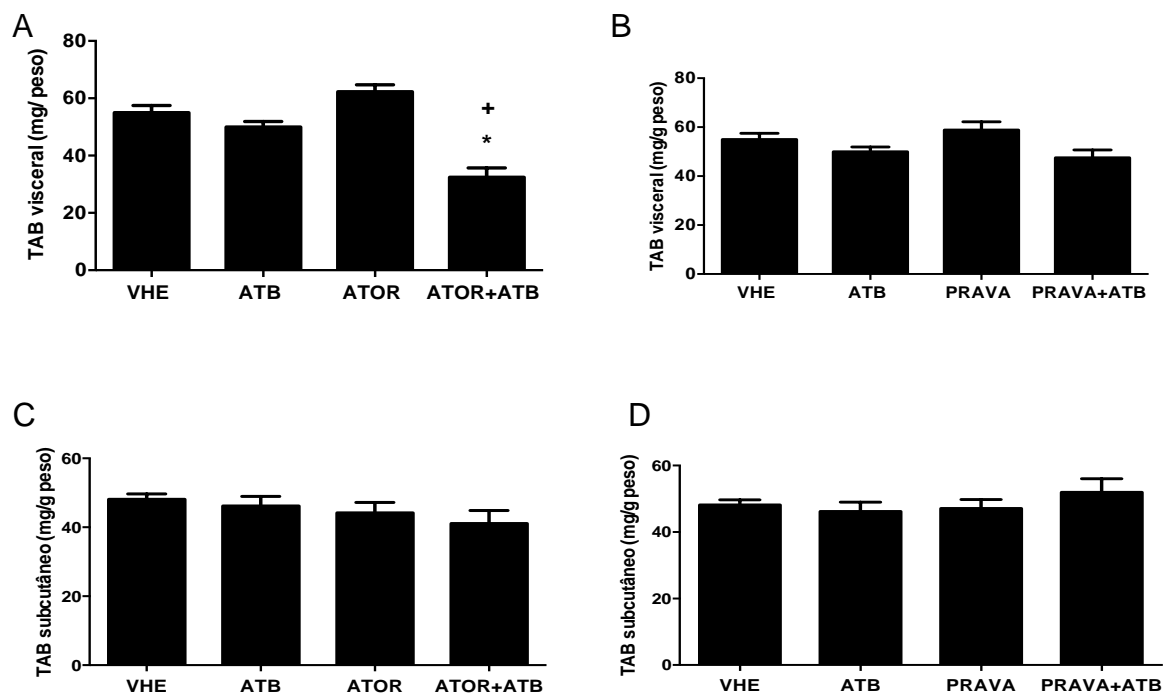


Figura 8 - Efeito da atorvastatina e da pravastatina sobre a adiposidade visceral e subcutânea na 21ª semana de vida de camundongos *ob/ob* machos, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos. Os camundongos foram alimentados com dieta controle ou dieta suplementada com atorvastatina (80 mg/kg/dia) ou pravastatina (80 mg/kg/dia) da 13ª até a 21ª semanas de vida, na ausência ou presença de antibióticos (ciprofloxacina 0,2 g/L e vancomicina 0,2 g/L), na água de beber, da 17ª à 21ª semana. Dados apresentados como média \pm EPM. (A, B) Tecido adiposo branco visceral. (C,D) Tecido adiposo branco subcutâneo. * $p < 0.05$ grupo atorvastatina+atb vs. grupo veículo ; + $p < 0.05$ grupo atorvastatina vs. grupo atorvastatina + antibiótico .One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-keuls; $n = 5$ camundongos por grupo. ATB: antibióticos; ATOR: atorvastatina; PRAVA: pravastatina.

A massa do tecido adiposo marrom interescapular não apresentou alteração significativa em todos os grupos, sugerindo apenas um ligeiro aumento da massa adiposa marrom interescapular nos grupos tratados isoladamente com atorvastatina e pravastatina. (Figuras 9A e 9B).

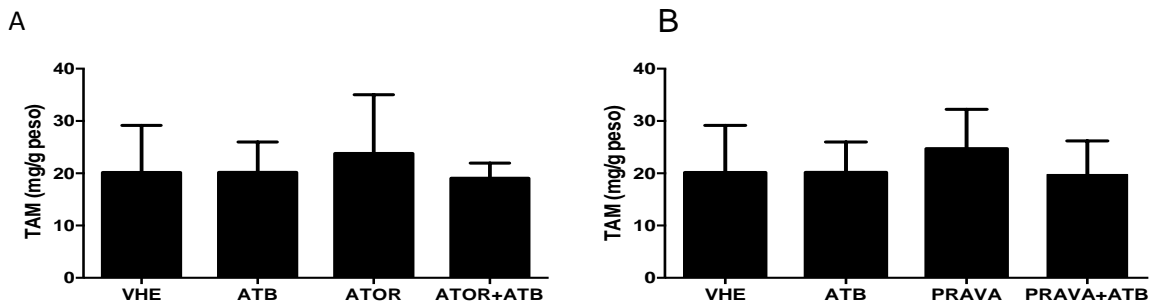


Figura 9 - Efeitos da atorvastatina e da pravastatina sobre a massa de tecido adiposo marrom interescapular de camundongos *ob/ob* machos, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos. Os camundongos foram alimentados com dieta controle ou dieta suplementada com atorvastatina (80 mg/kg/dia) ou pravastatina (80 mg/kg/dia) da 13^a até a 21^a semanas de vida, na ausência ou presença de antibióticos (ciprofloxacina 0,2 g/L e vancomicina 0,2 g/L), na água de beber, da 17^a à 21^a semana de vida. Dados apresentados como média \pm EPM. (A, B) Tecido adiposo marrom interescapular. One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-keuls; n = 5 camundongos por grupo. ATB: antibióticos; ATOR: atorvastatina; PRAVA: pravastatina; TAM: Tecido adiposo Marrom.

A massa do fígado (Figura 10A e 10B) e coração (Figura 10C e 10D) não apresentaram aumento nos grupos que receberam ambas as estatinas na presença e ausência de antibióticos na 21^a semana de vida.

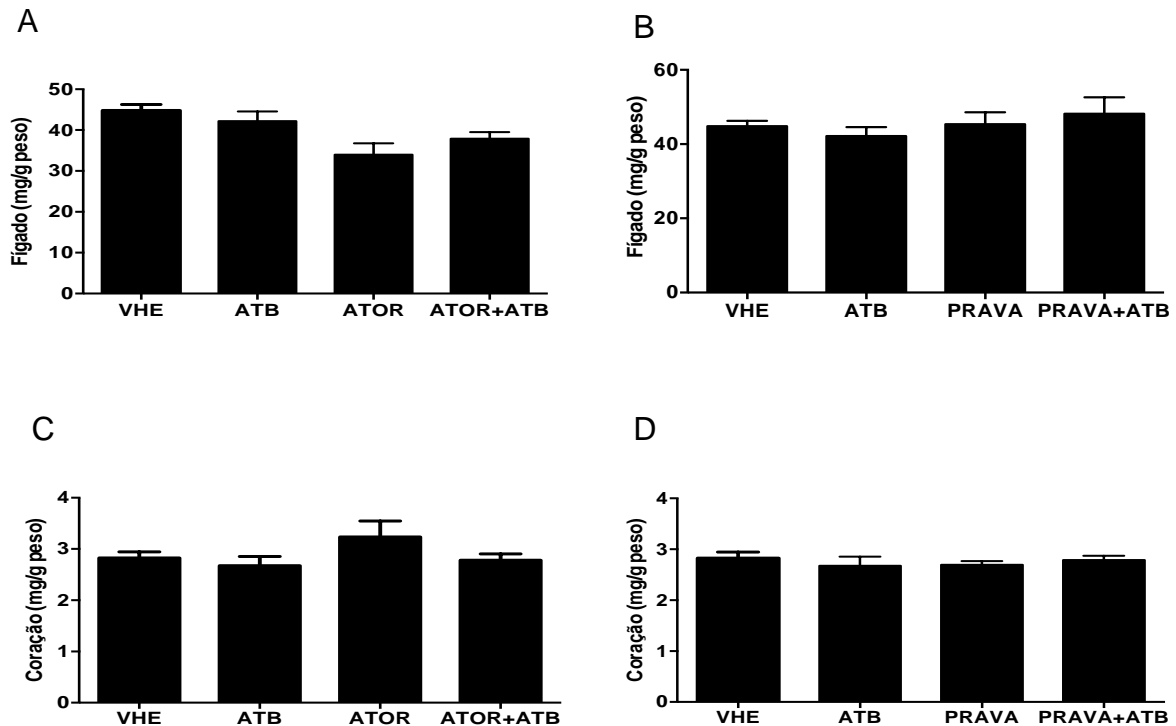
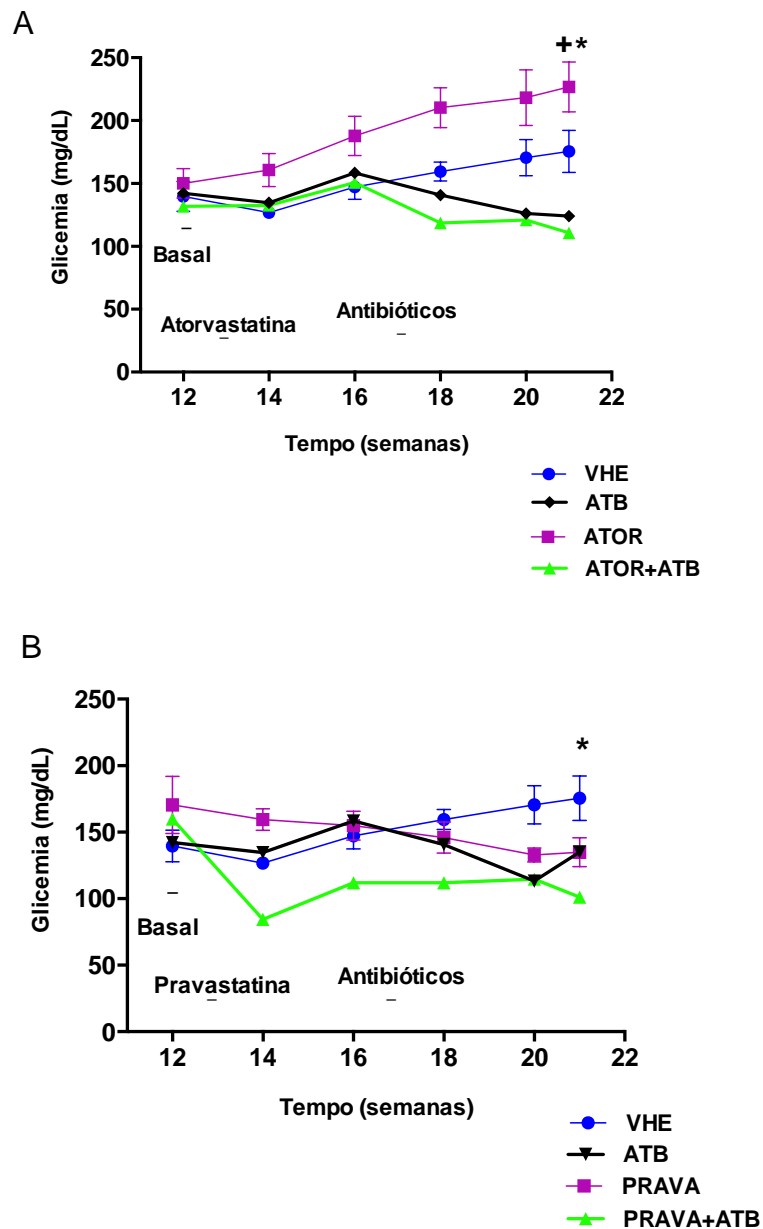


Figura 10 - Efeitos da atorvastatina e da pravastatina sobre a massa do fígado e coração de camundongos *ob/ob* machos, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos. Os camundongos foram alimentados com dieta controle ou dieta suplementada com atorvastatina (80 mg/kg/dia) ou pravastatina (80 mg/kg/dia) da 13^a até a 21^a semanas de vida, na ausência ou presença de antibióticos (ciprofloxacina 0,2 g/L e vancomicina 0,2 g/L), na água de beber, da 17^a à 21^a semana. Dados apresentados como média \pm EPM. (A, B) Fígado; (C,D) Coração. One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-keuls; n = 5 camundongos por grupo. ATB: antibióticos; ATOR: atorvastatina; PRAVA: pravastatina.

5.3 EFEITO DA ATORVASTATINA E DA PRAVASTATINA SOBRE A HOMEOSTASE DA GLICOSE E INSULINEMIA

Para investigar melhor o efeito do tratamento com estatina na homeostase da glicose em camundongos *ob/ob* e se ele foi afetado pela modulação da microbiota intestinal com antibióticos, medimos a concentração sérica de glicose em jejum. A partir da 12^a semana de vida e na 14^a, 16^a, 18^a, 20^a e 21^a semanas de vida foi aferida a glicemia de jejum de todos os grupos de animais. Após 5 semanas de tratamento, a ATOR aumentou persistentemente a glicemia em jejum até a 21^a semana, quando comparada com o veículo. Ao contrário, o co-tratamento com ATOR e os antibióticos promoveu reversão da hiperglicemia induzida pela ATOR (Figura 11A). O tratamento com PRAVA durante 8 semanas reduziu ligeiramente as

concentrações séricas de glicose no plasma em jejum após tratamento durante 8 semanas com PRAVA, e este efeito foi aumentado pelo co-tratamento com antibióticos (Figura 11B). O resultado sugere uma diminuição da concentração sérica de glicose plasmática em jejum em camundongos tratados com antibióticos. Além disso, os níveis de insulina em jejum, medidos no final do tratamento, não mostraram diferenças entre os grupos tratados com ATOR ou PRAVA (Figura 11C e 11D)



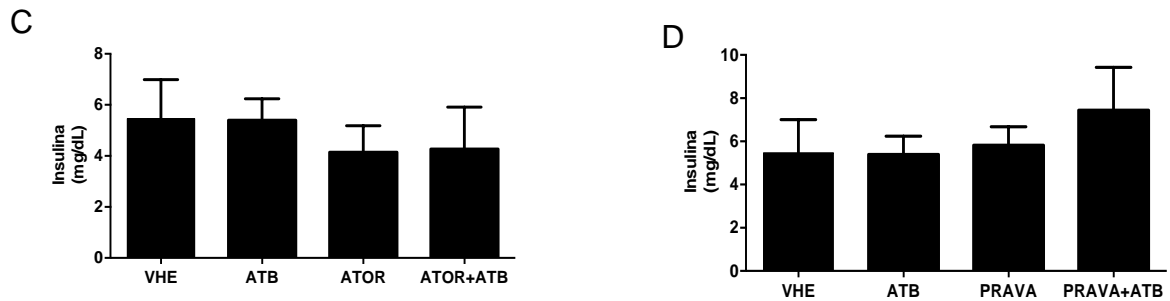


Figura 11 - Efeitos da atorvastatina e da pravastatina sobre as concentrações séricas de glicose e insulina em jejum de camundongos *ob/ob* machos, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos. Os camundongos foram alimentados com dieta controle ou dieta suplementada com atorvastatina (80 mg/kg/dia) ou pravastatina (80 mg/kg/dia) da 13^a até a 21^a semanas de vida, na ausência ou presença de antibióticos (ciprofloxacina 0,2 g/L e vancomicina 0,2 g/L), na água de beber, da 17^a à 21^a semana. Dados apresentados como média \pm EPM. (A, B) Concentração sérica de glicose em jejum; (C, D) concentrações séricas de insulina; * $p < 0,05$ grupo atorvastatina + atb vs. grupo veículo; + $p < 0,05$ grupo atorvastatina vs. grupo atorvastatina + atb; * $p < 0,05$ grupo pravastatina + atb vs grupo veículo. One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-keuls; $n = 5$ camundongos por grupo. ATB: antibióticos; ATOR: atorvastatina; PRAVA: pravastatina.

5.4 EFEITO DA ATORVASTATINA E DA PRAVASTATINA SOBRE O PERFIL LIPÍDICO

Como esperado, a ATOR e a PRAVA reduziram significativamente as concentrações séricas de colesterol LDL e o co-tratamento com antibiótico aumentou o efeito da ATOR (Figuras 12C e 12D). Além disso, o tratamento com antibióticos reduziu fortemente as concentrações séricas de LDL (Figuras 12C e 12D). No entanto, as concentrações séricas de colesterol (Figuras 12A e 12B) e triglicerídeos (Figuras 12E e 12F) em jejum não foram afetados pelo tratamento com ATOR ou PRAVA, isoladamente ou em combinação com antibióticos.

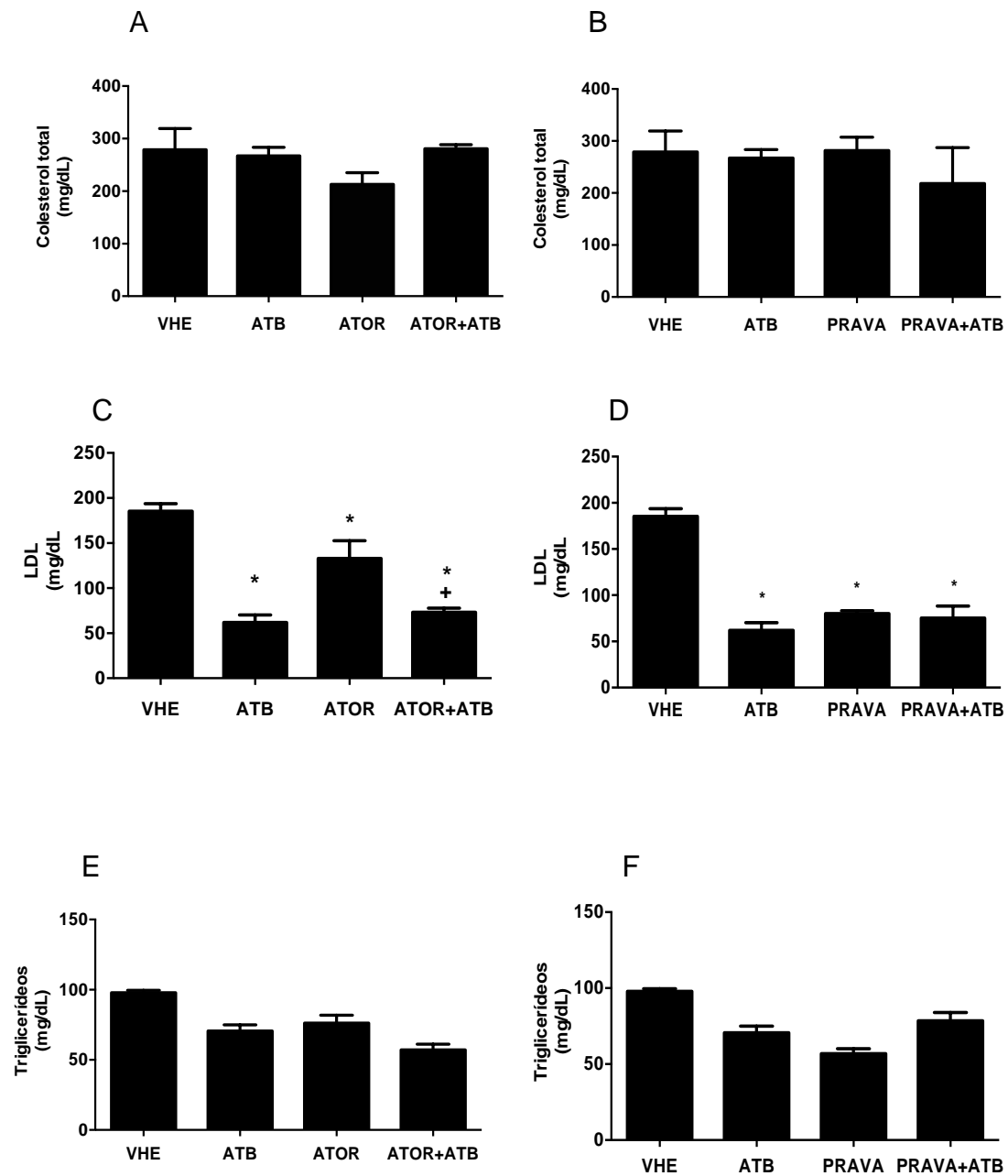


Figura 12 - Efeitos da atorvastatina e da pravastatina sobre os lipídeos séricos de camundongos *ob/ob* machos, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos. Os camundongos foram alimentados com dieta controle ou dieta suplementada com atorvastatina (80 mg/kg/dia) ou pravastatina (80 mg/kg/dia) da 13^a até a 21^a semanas de vida, na ausência ou presença de antibióticos (ciprofloxacina 0,2 g/L e vancomicina 0,2 g/L), na água de beber, da 17^a à 21^a semana. Dados apresentados como média \pm EPM. (A, B) Colesterol total; (C,D) LDL-colesterol; (C,D) triglicerídeos; * $p < 0,05$ vs grupo veículo; + $p < 0,05$ vs grupo atorvastatina. One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-keuls; $n = 5$ camundongos por grupo. ATB: antibióticos; ATOR: atorvastatina; PRAVA: pravastatina; LDL: lipoproteína de baixa densidade.

5.5 EFEITO DA ATORVASTATINA E PRAVASTATINA SOBRE AS ENZIMAS HEPÁTICAS E SOBRE A ESTEATOSE HEPÁTICA

O tratamento com ambas as estatinas reduziu significativamente as concentrações séricas de ALT (Figuras 13A e 13B) e AST (Figuras 13C e 13D). Os antibióticos isoladamente também reduziram significativamente as concentrações séricas de enzimas hepáticas e não melhoraram o efeito das estatinas.

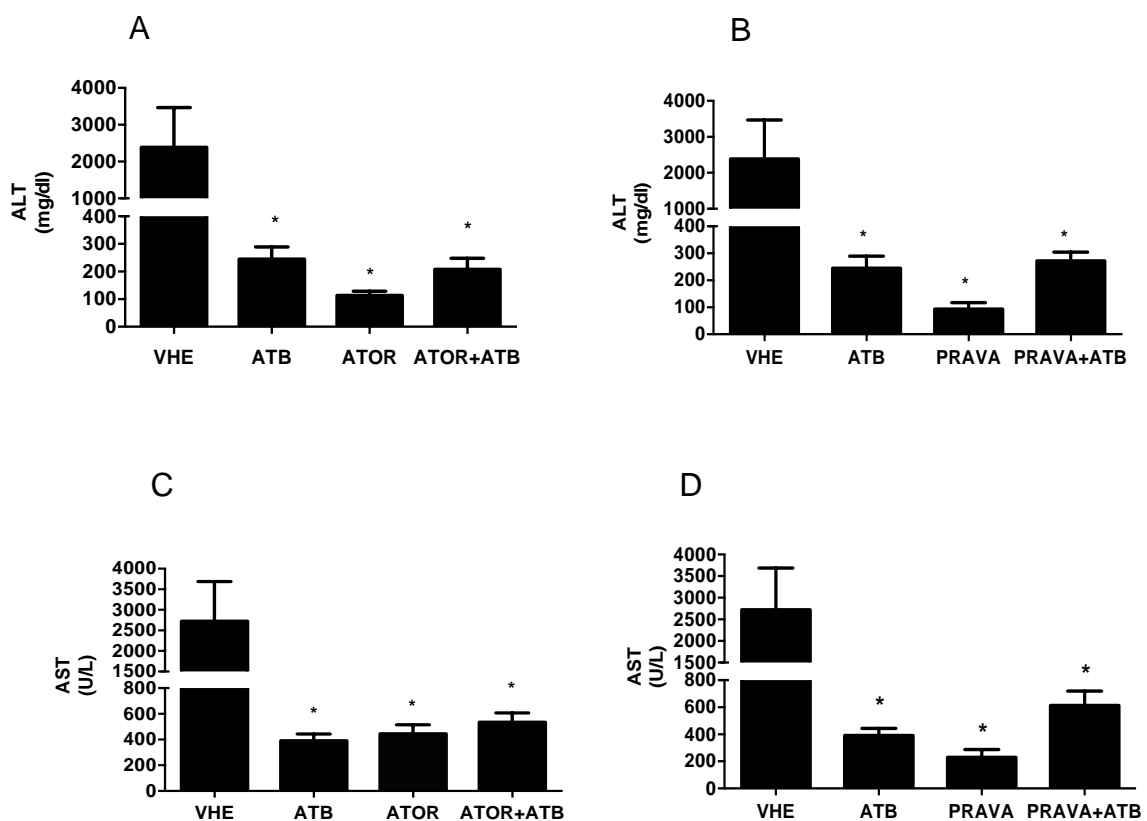


Figura 13 - Efeitos da atorvastatina e da pravastatina sobre as enzimas hepáticas de camundongos *ob/ob* machos, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos. Os camundongos foram alimentados com dieta controle ou dieta suplementada com atorvastatina (80 mg/kg/dia) ou pravastatina (80 mg/kg/dia) da 13^a até a 21^a semanas de vida, na ausência ou presença de antibióticos (ciprofloxacina 0,2 g/L e vancomicina 0,2 g/L), na água de beber, da 17^a à 21^a semana. Dados apresentados como média \pm EPM. (A, B) ALT, (C,D) AST. * $p < 0,05$ vs grupo veículo. One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-keuls; $n = 5$ camundongos por grupo. ATB: antibióticos; ATOR: atorvastatina; PRAVA: pravastatina; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase.

O fígado de camundongos *ob/ob* não tratados apresentou acúmulo significativo de lipídios, que foi aumentado pelo tratamento com antibióticos. Pelo contrário, a ATOR e a PRAVA reduziram a esteatose hepática e este efeito foi atenuado pelo co-tratamento com antibióticos (Figura 14).

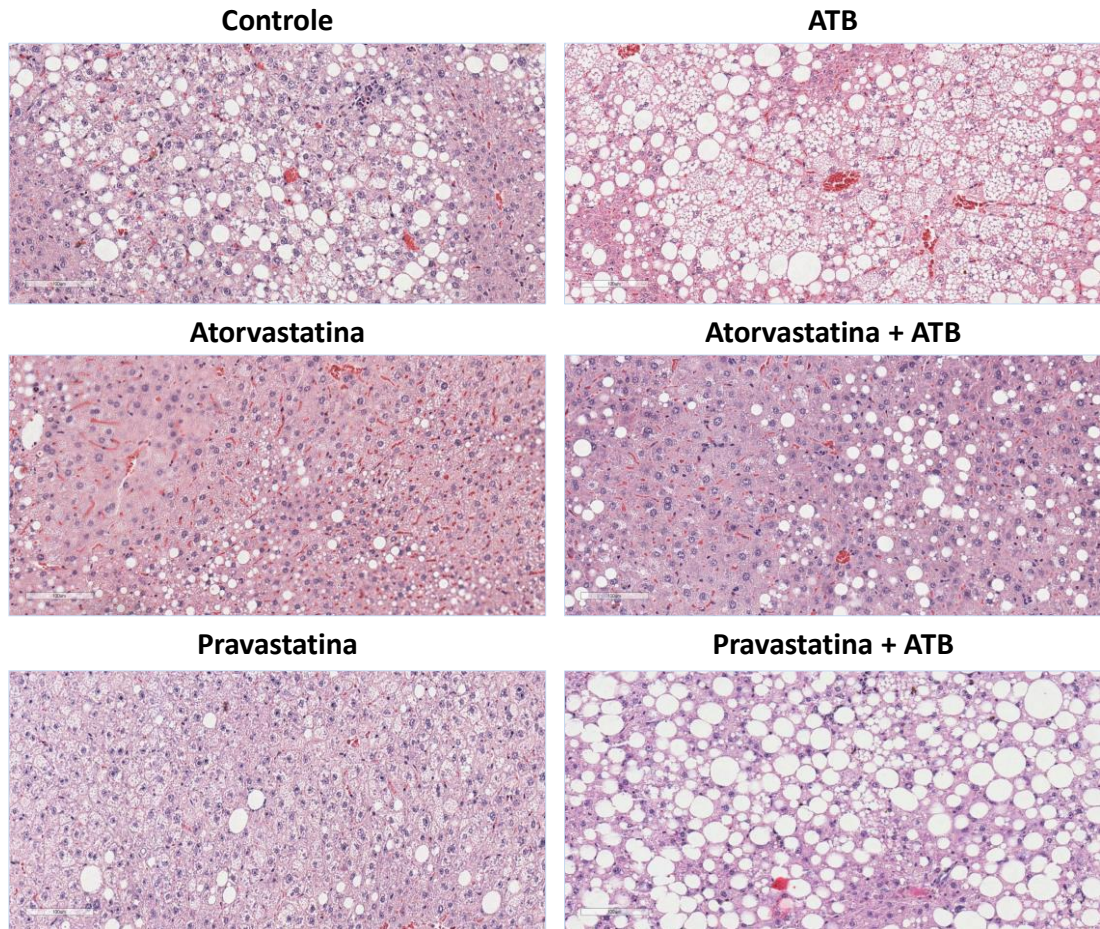


Figura 14 - Efeitos da atorvastatina e da pravastatina sobre características morfológicas do fígado após 8 semanas de tratamento de camundongos *ob/ob* machos, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos. Os camundongos foram alimentados com dieta controle ou dieta suplementada com atorvastatina (80 mg/kg/dia) ou pravastatina (80 mg/kg/dia) da 13^a até a 21^a semanas de vida, na ausência ou presença de antibióticos (ciprofloxacina 0,2 g/L e vancomicina 0,2 g/L), na água de beber, da 17^a à 21^a semana. Dados apresentados como média \pm EPM. (A) Histologia do fígado. Amostras de fígado coradas com hematoxilina e eosina (HE), de um camundongo representativo de cada grupo. Imagens mostradas com aumento de 10 vezes e escala de 50 μ m. n = 5 camundongos por grupo. ATB: antibióticos; ATOR: atorvastatina; PRAVA: pravastatina.

5.6 EFEITO DA ATORVASTATINA E DA PRAVASTATINA SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL

Para avaliar a relação entre a microbiota intestinal e o efeito hiperglicemiante das estatinas, analisamos a bactéria 16S rRNA. Como previsto, o número total de cópias do gene 16S rRNA das bactérias foi reduzido significativamente pelo tratamento com antibióticos. No entanto, o tratamento com estatina ATOR ou PRAVA reduziu ligeiramente, mas não de forma significativa as bactérias totais. É interessante notar que a redução no número total de cópias do gene 16S rRNA de bactérias foi revertida por co-tratamento com ambas as estatinas (Figuras 15A e 15B).

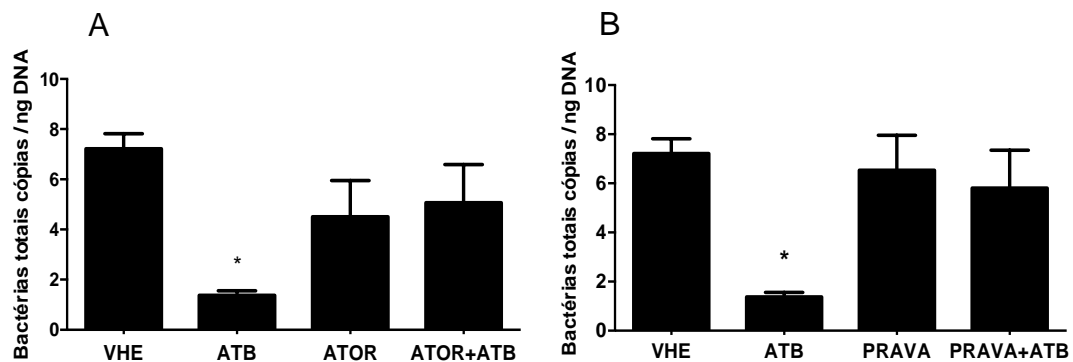


Figura 15 - Efeitos da atorvastatina e da pravastatina sobre a quantidade de bactérias totais de camundongos *ob/ob* machos, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos. Os camundongos foram alimentados com dieta controle ou dieta suplementada com atorvastatina (80 mg/kg/dia) ou pravastatina (80 mg/kg/dia) da 13^a até a 21^a semanas de vida, na ausência ou presença de antibióticos (ciprofloxacina 0,2 g/L e vancomicina 0,2 g/L), na água de beber, da 17^a à 21^a semana. Dados apresentados como média ± EPM. (A, B) número total de cópias do gene 16S rRNA de bactérias nas fezes. * $p < 0,05$ vs grupo veículo. One-way ANOVA seguido por teste de comparação múltipla kruskal-wallis. $n = 5$ camundongos por grupo. ATB: antibióticos; ATOR: atorvastatina; PRAVA: pravastatina.

O tratamento com ATOR e PRAVA não afetou a quantidade fecal de Firmicutes, mas o co-tratamento com ATOR e antibióticos erradicou a quantidade de Firmicutes (Figura 16A, 16B). O tratamento com antibióticos eliminou a quantidade de Firmicutes e Bacteroidetes quando comparado com o veículo (Figura 16 A,B,C,D). O tratamento com ATOR, isoladamente, reduziu a quantidade de Bacteroidetes, que foram adicionalmente reduzidos significativamente pelo co-tratamento com antibióticos (Figuras 16C). Diferentemente, o tratamento com PRAVA não alterou a quantidade de Bacteroidetes e o co-tratamento de PRAVA com antibióticos promoveu a redução deste filo (Figura 16D). Foi observada, ainda, menor razão Firmicutes/ Bacteroidetes nos grupos tratados com antibióticos ou co-tratados com ATOR e antibióticos (Figura 16E).

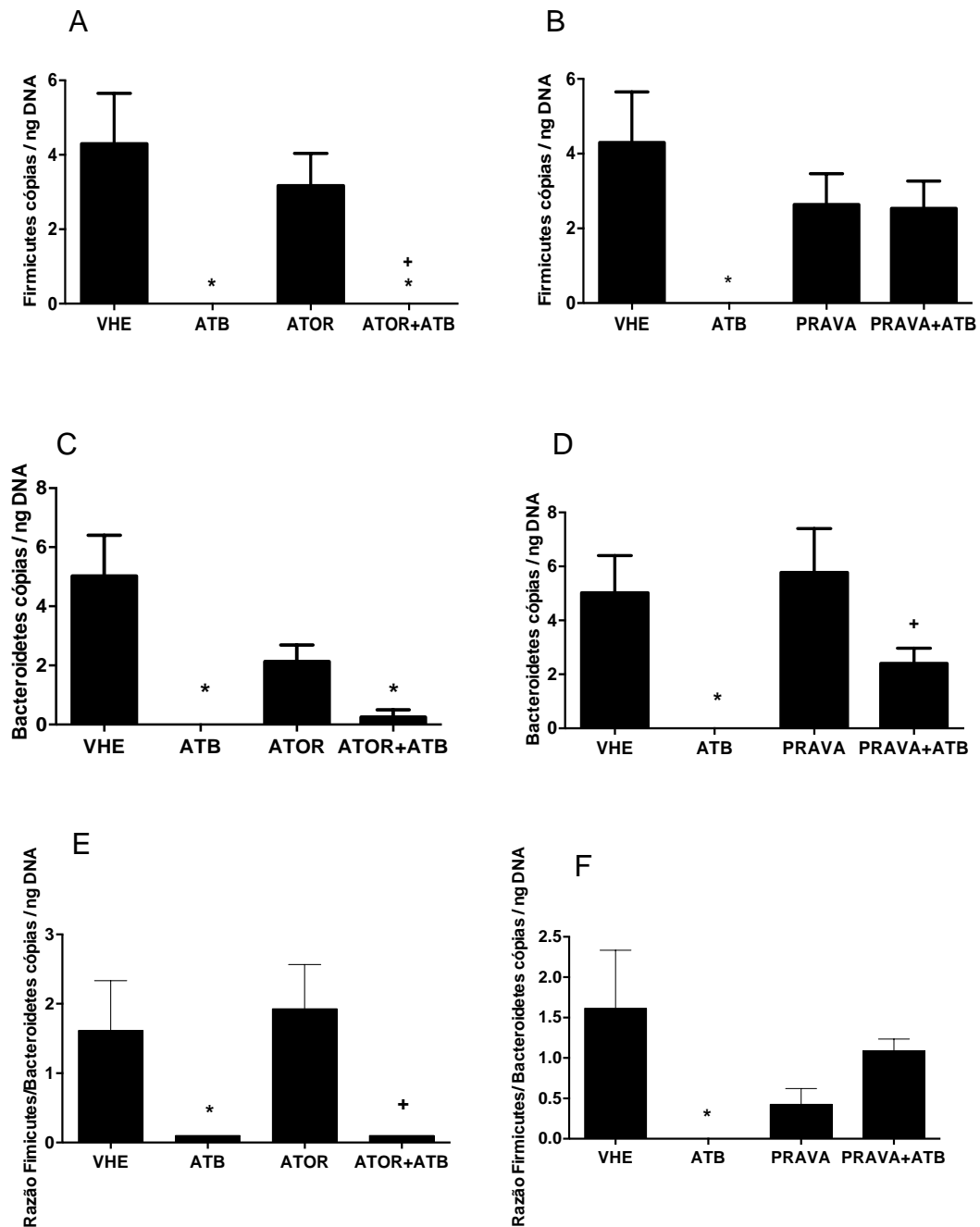


Figura 16 - Efeitos da atorvastatina e da pravastatina na microbiota intestinal, de camundongos *ob/ob* machos, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos. Os camundongos foram alimentados com dieta controle ou dieta suplementada com atorvastatina (80 mg/kg/dia) ou pravastatina (80 mg/kg/dia) da 13^a até a 21^a semanas de vida, na ausência ou presença de antibióticos (ciprofloxacina 0,2 g/L e vancomicina 0,2 g/L), na água de beber, da 17^a à 21^a semana. Dados apresentados como média \pm EPM. Número de cópias de (A,B) Firmicutes; (C,D) Bacteroidetes; (E,F) razão Firmicutes / Bacteroidetes; * $p < 0,05$ vs grupo veículo; + $p < 0,05$ vs grupo atorvastatina; + $p < 0,05$ vs grupo pravastatina. One-way ANOVA seguido por teste de comparação múltipla kruskal-wallis $n = 5$ camundongos por grupo. ATB: antibióticos; ATOR: atorvastatina; PRAVA: pravastatina.

Não houve alterações na quantidade relativa de *Lactobacillus* spp em camundongos tratados com estatina isoladamente ou em combinação com antibióticos (Figura 17A e 17B).

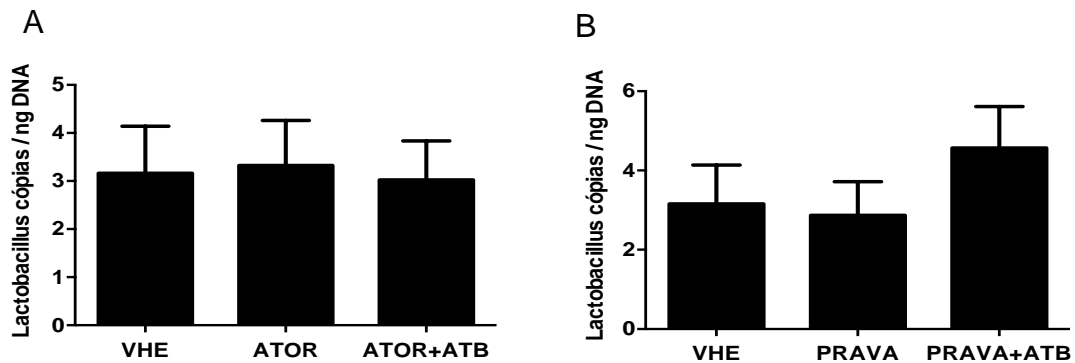


Figura 17 - Efeitos da atorvastatina e da pravastatina na microbiota intestinal, de camundongos *ob/ob* machos, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos. Os camundongos foram alimentados com dieta controle ou dieta suplementada com atorvastatina (80 mg/kg/dia) ou pravastatina (80 mg/kg/dia) da 13^a até a 21^a semanas de vida, na ausência ou presença de antibióticos (ciprofloxacina 0,2 g/L e vancomicina 0,2 g/L), na água de beber, da 17^a à 21^a semana. Dados apresentados como média \pm EPM. Número de cópias de (A,B) *Lactobacillus* spp nas fezes. One-way ANOVA seguido por teste de comparação múltipla kruskal-wallis. n = 5 camundongos por grupo. ATB: antibióticos; ATOR: atorvastatina; PRAVA: pravastatina.

Além disso, o tratamento com ATOR ou PRAVA não alterou a quantidade relativa de *Akkermansia muciniphila*, mas o co-tratamento com ATOR e antibióticos aumentou significativamente quando comparado ao veículo ou ao tratamento apenas com ATOR (Figuras 18A e 18B)

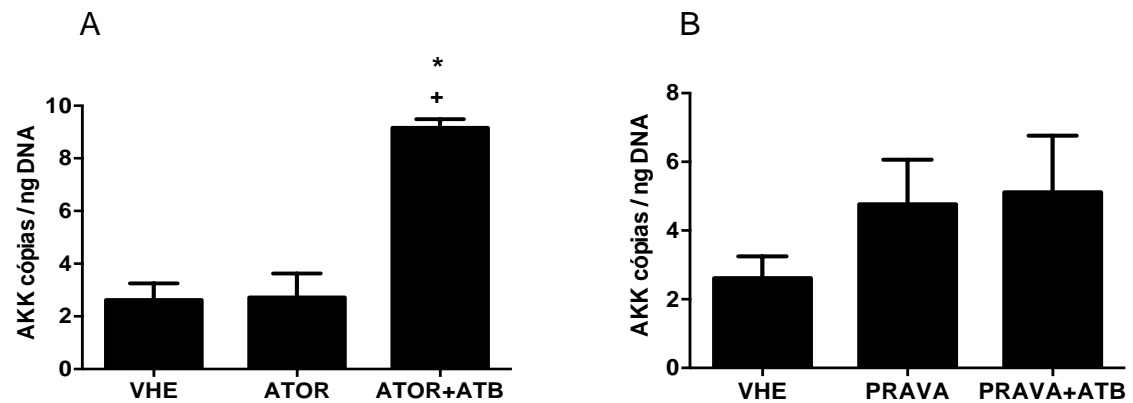


Figura 18 - Efeitos da atorvastatina e da pravastatina na microbiota intestinal, de camundongos *ob/ob* machos, na ausência ou presença de modulação da microbiota intestinal por antibióticos. Os camundongos foram alimentados com dieta controle ou dieta suplementada com atorvastatina (80 mg/kg/dia) ou pravastatina (80 mg/kg/dia) da 13^a até a 21^a semanas de vida, na ausência ou presença de antibióticos (ciprofloxacina 0,2 g/L e vancomicina 0,2 g/L), na água de beber, da 17^a à 21^a semana. Dados apresentados como média \pm EPM. Número de cópias de (A,B) *Akkermansia muciniphila* nas fezes; * $p < 0,05$ vs grupo veículo; + $p < 0,05$ vs grupo atorvastatina. One-way ANOVA seguido por teste de comparação múltipla kruskal-wallis. $n = 5$ camundongos por grupo. ATB: antibióticos; ATOR: atorvastatina; PRAVA: pravastatina; AKK: *Akkermansia*.

6 DISCUSSÃO

As estatinas são uma classe de fármacos amplamente utilizados em todo o mundo para reduzir a concentração sérica de colesterol e reduzir o risco de doença cardiovascular. Embora sejam altamente efetivas em prevenção cardiovascular, sobretudo secundária, seu consumo é associado a potenciais efeitos adversos em alguns indivíduos. Os eventos mais comuns associados à intolerância à estatina são a miopatia e, mais recentemente, foi observado aumento do risco de desenvolver DM2. No entanto, os mecanismos implicados no aumento do risco de DM2 não são totalmente conhecidos (137, 142) . Nesse sentido, vários estudos, clínicos e experimentais, vêm tentando demonstrar possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento da hiperglicemia induzida por algumas estatinas (15, 65, 143-146)

No presente estudo, mostramos que o tratamento em longo prazo com dose elevada de ATOR, mas não de PRAVA, induziu hiperglicemia em camundongos *ob/ob*, e que a hiperglicemia induzida por ATOR foi melhorada pela modulação da microbiota intestinal com uma combinação de ciprofloxacina e vancomicina. No entanto, não foi possível descartar que a reversão da hiperglicemia induzida pela ATOR foi independente de alterações do peso corporal, uma vez que camundongos tratados com ATOR e antibióticos apresentaram redução de peso quando comparados àqueles tratados apenas com ATOR.

No presente estudo, a glicemia em jejum de camundongos *ob/ob* tratados com ATOR aumentou progressivamente e esta alteração não foi acompanhada por alterações das concentrações séricas de insulina em jejum, avaliadas após 8 semanas de tratamento. Por outro lado, nenhuma mudança na glicemia em jejum foi observada em camundongos tratados com PRAVA. Vários estudos anteriores mostraram a associação entre a administração de estatinas e o diabetes. Há, contudo, resultados variados de acordo com a estatina administrada e a dose do fármaco (61, 62, 147). A atorvastatina é associada, consistentemente ao risco de hiperglicemia em humanos (148, 149), porém em modelos animais os resultados são variados. Em alguns estudos em modelos animais de DM2, foi observada melhora da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina em resposta ao tratamento com

atorvastatina (146, 150, 151) , ao passo que em outros estudos foi observada hiperglicemia, e resistência à insulina (65, 145) . Estas aparentes divergências nos estudos que envolveram o tratamento com atorvastatina podem estar relacionadas, pelo menos em parte, a diferentes protocolos de tratamento ou a diferenças na susceptibilidade dos vários modelos murinos de DM2 aos efeitos desta estatina na homeostase da glicose. Por outro lado, a pravastatina é associada à melhora da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina em estudos *in vivo* (14, 152, 153). Kana e colaboradores observaram que a pravastatina preveniu o desenvolvimento de obesidade e diabetes em camundongos com obesidade induzida por dieta (DIO) tratados com 100 mg/kg/dia durante 28 dias (14) .

As estatinas podem alterar a homeostase da glicose por diferentes mecanismos. Foi observado que as estatinas lipofílicas, como a atorvastatina, comprometem a ação da insulina em linhagem de células musculares esqueléticas C2C12 (154) e em adipócitos 3T3-L1 (65, 155), além de inibir o SLC2A4, que promove o transporte facilitado de glicose (65). Em contraste, estas alterações não foram observadas com a pravastatina (152, 154, 155), presumivelmente devido às suas propriedades hidrofílicas, que reduzem sua capacidade de entrar nas células e afetar as proteínas intracelulares (155). Em consistência com esta possibilidade, as estatinas lipofílicas, mas não as hidrofílicas, comprometeram, além da ação da insulina, sua secreção pelas células beta pancreáticas (148).

Os achados descritos acima, originados de estudos em modelos animais e em cultura de células, são consistentes com os achados de estudos clínicos, que sugerem que as estatinas lipofílicas, mas não as hidrofílicas, comprometem a homeostase da glicose. A pravastatina na dose de 40 mg por dia está associada a menor risco de hiperglicemia, ao passo que a rosuvastatina na dose de 20 mg por dia e a atorvastatina nas doses de 40 mg e 80 mg por dia estão associadas a maior risco (60, 156).

Além disso, a associação entre estatinas e hiperglicemia parece ser dose-dependente (50, 60). De fato, a indução de hiperglicemia pelo tratamento com atorvastatina, em modelos animais, é observada em estudos envolvendo a administração de doses elevadas, mas não de doses baixas desta estatina (65, 146, 151, 157). As estatinas têm efeitos anti-inflamatórios e anti-oxidantes bem

estabelecidos, que podem influenciar favoravelmente a sensibilidade à insulina (158, 159) . Até o momento, não é possível descartar que o efeito das estatinas lipofílicas na sinalização da insulina seja o resultado final de seus efeitos desfavoráveis sobre as proteínas da via de sinalização da insulina e suas propriedades anti-inflamatórias favoráveis, e que a predominância do efeito favorável ou desfavorável seja dependente de sua dose. Assim, é possível que doses mais elevadas, como a usada no presente estudo, resultem em balanço desfavorável entre os efeitos positivos e negativos sobre a sinalização da insulina e, assim, como resultado final de prejuízo à ação da insulina. Em consistência com esta possibilidade, a maioria dos estudos em animais que descreveu efeitos favoráveis da atorvastatina na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina utilizaram doses menores dessa estatina (146, 151, 157).

O tratamento com atorvastatina e pravastatina reduziu significativamente a deposição de lipídios nos fígados dos camundongos *ob/ob*, consistentemente com dados de estudos anteriores envolvendo camundongos (160, 161) e humanos (162-164). A observação simultânea de uma tendência de redução das concentrações plasmáticas de triglicerídeos sugere que este efeito tenha sido devido ao aumento da oxidação lipídica, o que também está de acordo com dados de estudos anteriores (165) . É importante observar que, apesar da melhora da esteatose hepática e presumivelmente da lipotoxicidade hepática e da resistência à insulina, o tratamento com atorvastatina promoveu hiperglicemia. Isso reforça que o efeito dessa estatina lipofílica na homeostase da glicose é complexo e, em última instância, resulta do equilíbrio entre suas ações metabólicas favoráveis e desfavoráveis. Curiosamente, o tratamento com antibióticos piorou o acúmulo de lipídeos hepáticos, além de reverter parcialmente os benefícios das estatinas sobre o acúmulo de lipídios hepáticos, porém diminuiu as concentrações plasmáticas de colesterol LDL e triglicerídeos, de forma semelhante às estatinas. Esses achados não seriam esperados no cenário de reversão da hiperglicemia induzida pela atorvastatina em camundongos tratados com antibióticos, e pode-se especular que os efeitos positivos do co-tratamento com antibióticos e atorvastatina na homeostase da glicose possam refletir as ações favoráveis da modulação da microbiota intestinal não no fígado, mas em outros tecidos, como o pâncreas endócrino, músculo esquelético e tecido adiposo. Além disso, é improvável que esses achados estejam ligados à toxicidade induzida por

antibióticos, uma vez que os animais tratados com a combinação de ciprofloxacina e vancomicina apresentaram redução da concentração sérica de enzimas hepáticas.

A composição microbiana intestinal é cada vez mais reconhecida como um regulador chave da homeostase da glicose. Assim, investigamos características específicas da microbiota do intestino de camundongos *ob/ob* tratados com estatinas e se a administração de antibióticos para promover a modulação da microbiota intestinal poderia afetar a hiperglicemia induzida pela atorvastatina. O tratamento com antibióticos reduziu a glicemia de jejum, como esperado, em face a dados de estudos anteriores (131, 166) . Entretanto, a hiperglicemia dos camundongos *ob/ob* tratados com atorvastatina foi significativamente melhorada pelo tratamento simultâneo com vancomicina e ciprofloxacina.

A modulação da microbiota intestinal apenas com antibióticos promoveu redução significativa do conteúdo bacteriano total fecal e praticamente o desaparecimento de DNA de Firmicutes e Bacteroidetes nas fezes, em avaliação por PCR em tempo real. Por outro lado, camundongos tratados simultaneamente com estatinas e antibióticos também mostraram mudanças significativas em seus perfis bacterianos intestinais, embora diferentes (167). Estes achados sugerem, em conjunto, que as alterações da microbiota intestinal possam estar envolvidas na reversão da hiperglicemia induzida pela atorvastatina. Camundongos tratados com atorvastatina apresentaram redução da quantidade fecal de Bacteroidetes, mantendo a de Firmicutes, presumivelmente levando a uma maior razão Firmicutes/Bacteroidetes. A relação entre esses dois principais filos bacterianos tem sido associada ao fenótipo metabólico tanto em humanos quanto em roedores. Uma menor relação Firmicutes/Bacteroidetes está associada a melhor controle da glicose em humanos (168) e também com intervenções que melhoram a tolerância à glicose em camundongos (169). Portanto, a maior proporção de Firmicutes para Bacteroidetes encontrada em camundongos tratados com atorvastatina em nosso estudo poderia estar ligada à hiperglicemia. Por outro lado, em animais tratados com pravastatina, nenhuma alteração no conteúdo fecal de Bacteroidetes foi encontrada, enquanto uma leve redução no conteúdo de Firmicutes foi observada. Curiosamente, os antibióticos levaram a uma redução mais proeminente no conteúdo fecal de Bacteroidetes do que de Firmicutes em camundongos tratados

com atorvastatina, e isso pode ter contribuído para a melhora da hiperglicemia na presença de antibióticos e atorvastatina.

Cepas bacterianas específicas estão associadas a um fenótipo metabólico mais saudável. Entre elas, destacam-se *Lactobacillus sp* e *A. muciniphila*. Assim, analisamos o conteúdo destas duas cepas no DNA fecal de camundongos tratados com veículo ou atorvastatina, com ou sem o tratamento simultâneo com antibióticos. Nenhuma alteração foi observada no conteúdo fecal de *Lactobacillus sp* em qualquer grupo de tratamento, mas a administração de antibióticos em camundongos tratados com atorvastatina promoveu um notável aumento no conteúdo fecal de *A. muciniphila*. Este efeito não foi observado em camundongos tratados apenas com atorvastatina, ou com pravastatina ou pravastatina na presença de antibióticos. A *A. muciniphila* é uma bactéria gram-negativa que degrada a mucina e que reside na camada de muco do intestino; está altamente correlacionada com melhor tolerância à glicose em humanos (169, 170). Essa associação parece ser causal, uma vez que a administração de *A. muciniphila* (133) ou de sua proteína de membrana externa purificada Amuc_1100 (171) melhora o controle glicêmico em camundongos diabéticos. A representação fecal aumentada desta espécie bacteriana em camundongos tratados simultaneamente com atorvastatina e antibióticos poderia estar, assim, implicada na melhora da homeostase da glicose neste grupo, quando comparado com camundongos tratados apenas com atorvastatina. Além disso, a ausência de alterações do conteúdo de *A. muciniphila* fecal em outros grupos de tratamento (antibióticos e pravastatina isoladamente ou em combinação) sugere que os efeitos dos antibióticos na composição da microbiota intestinal e nos resultados metabólicos podem ser variáveis conforme o contexto específico. Ou seja, é possível que sejam influenciados por outros fatores que provavelmente determinam a estrutura da microbiota intestinal, como o próprio tratamento com estatina.

É importante notar que este estudo tem algumas limitações. Primeiramente, estudamos camundongos *ob/ob*, caracterizados por deficiência de leptina, um modelo monogênico de diabetes, e nosso achado de que a modulação da microbiota intestinal por antibióticos protege contra hiperglicemia induzida por atorvastatina pode não ser generalizável para formas mais comuns de diabetes tipo 2. Segundo,

não foi possível estabelecer que a associação entre alterações na composição da microbiota intestinal, incluindo aumento do conteúdo fecal de *A. muciniphila* e melhora da hiperglicemia induzida por atorvastatina é causal.

Para melhor explorar os resultados deste trabalho, seria interessante realizar experimentos com transferência da microbiota de animais tratados com estatinas para animais isentos de germes e avaliar se o efeito diabetogênico ocorreria (isso provaria que a microbiota é modulada pela estatina e isso influencia o risco de hiperglicemia). Experimentos com a administração oral de *Akkermansia* para animais tratados com atorvastatina também seriam importantes para avaliar se reverteria a hiperglicemia.

Dessa forma nossos dados, em conjunto, sugerem que uma modulação da microbiota intestinal, com promoção do aumento da população da bactéria *Akkermansia muciniphila*, poderia influenciar positivamente o efeito diabetogênico da atorvastatina. É possível, assim, que a modificação da microbiota intestinal em favor da *Akkermansia muciniphila* possa representar uma estratégia de prevenção de hiperglicemia induzida pelo uso de atorvastatina.

7 CONCLUSÃO

Nossos achados indicam que o tratamento com altas doses de atorvastatina, mas não com pravastatina, piora a hiperglicemia em camundongos *ob/ob*, e que a modulação da microbiota intestinal por antibióticos pode melhorar a hiperglicemia induzida pela atorvastatina. Este último efeito parece ser independente de alterações na produção ou sensibilidade da insulina, dado que não houve alterações nas concentrações séricas de insulina em jejum em resposta ao tratamento com a combinação de atorvastatina e antibióticos. No entanto, possivelmente está relacionada a modificações na estrutura microbiana do intestino, dadas as alterações no conteúdo fecal de Firmicutes e Bacteroidetes e expansão de *Akkermansia muciniphila*. Mais estudos são necessários para estabelecer o papel da *Akkermansia muciniphila* na reversão da hiperglicemia induzida por atorvastatina e se a modificação da estrutura da comunidade microbiana intestinal pode ser uma estratégia para prevenir o aumento do risco de DM2 associado à terapia com estatina.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, Linnenkamp U, Guariguata L, Cho NH, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes research and clinical practice*. 2017;128:40-50.
2. Vollenweider P, von Eckardstein A, Widmann C. HDLs, diabetes, and metabolic syndrome. *Handbook of experimental pharmacology*. 2015;224:405-21.
3. Garvey WT. Effects of insulin resistance and type 2 diabetes on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance. *MMW Fortschritte der Medizin*. 2003;52(2):453-62.
4. Cholesterol Treatment Trialists C, Kearney PM, Blackwell L, Collins R, Keech A, Simes J, et al. Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18,686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis. *Lancet (London, England)*. 2008;371(9607):117-25.
5. Cholesterol Treatment Trialists C, Baigent C, Blackwell L, Emberson J, Holland LE, Reith C, et al. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet (London, England)*. 2010;376(9753):1670-81.
6. Statins: Actions, side effects, and administration [Internet]. 2015 [cited 30 april 2015].
7. Kashani A, Phillips CO, Foody JM, Wang Y, Mangalmurti S, Ko DT, et al. Risks associated with statin therapy: a systematic overview of randomized clinical trials. *Circulation*. 2006;114(25):2788-97.
8. Armitage J. The safety of statins in clinical practice. *Lancet (London, England)*. 2007;370(9601):1781-90.
9. Russo MW, Hoofnagle JH, Gu J, Fontana RJ, Barnhart H, Kleiner DE, et al. Spectrum of statin hepatotoxicity: experience of the drug-induced liver injury network. *Hepatology*. 2014;60(2):679-86.
10. Guthrie RM, Martin DR. The safety of rosuvastatin: effects on renal and hepatic function. *Expert opinion on drug safety*. 2007;6(5):573-81.
11. Golomb BA, Kane T, Dimsdale JE. Severe irritability associated with statin cholesterol-lowering drugs. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2004;97(4):229-35.
12. Redelmeier DA, Thiruchelvam D, Daneman N. Delirium after elective surgery among elderly patients taking statins. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2008;179(7):645-52.
13. Browning DR, Martin RM. Statins and risk of cancer: a systematic review and metaanalysis. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2007;120(4):833-43.
14. Araki K, Masaki T, Katsuragi I, Kakuma T, Yoshimatsu H. Effects of pravastatin on obesity, diabetes, and adiponectin in diet-induced obese mice. *Obesity*. 2008;16(9):2068-73.

15. Yada T, Nakata M, Shiraishi T, Kakei M. Inhibition by simvastatin, but not pravastatin, of glucose-induced cytosolic Ca²⁺ signalling and insulin secretion due to blockade of L-type Ca²⁺ channels in rat islet beta-cells. *British journal of pharmacology*. 1999;126(5):1205-13.
16. Ishikawa M, Okajima F, Inoue N, Motomura K, Kato T, Takahashi A, et al. Distinct effects of pravastatin, atorvastatin, and simvastatin on insulin secretion from a beta-cell line, MIN6 cells. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2006;13(6):329-35.
17. Zhao W, Zhao SP. Different effects of statins on induction of diabetes mellitus: an experimental study. *Drug design, development and therapy*. 2015;9:6211-23.
18. Bang CN, Okin PM. Statin treatment, new-onset diabetes, and other adverse effects: a systematic review. *Current cardiology reports*. 2014;16(3):461.
19. Park DY, Ahn YT, Huh CS, Jeon SM, Choi MS. The inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* KY1032 cell extract on the adipogenesis of 3T3-L1 Cells. *Journal of medicinal food*. 2011;14(6):670-5.
20. Musso G, Gambino R, Cassader M. Obesity, diabetes, and gut microbiota: the hygiene hypothesis expanded? *Diabetes care*. 2010;33(10):2277-84.
21. Cao ZJ, Yu JC, Kang WM, Ma ZQ. [Research advances in the gut microbiota and inflammation in obesity]. *Zhongguo yi xue ke xue yuan xue bao Acta Academiae Medicinae Sinicae*. 2013;35(4):462-5.
22. Bays HE. "Sick fat," metabolic disease, and atherosclerosis. *The American journal of medicine*. 2009;122(1 Suppl):S26-37.
23. Knight JA. Diseases and disorders associated with excess body weight. *Annals of clinical and laboratory science*. 2011;41(2):107-21.
24. Carmienke S, Freitag MH, Pischon T, Schlattmann P, Fankhaenel T, Goebel H, et al. General and abdominal obesity parameters and their combination in relation to mortality: a systematic review and meta-regression analysis. *European journal of clinical nutrition*. 2013;67(6):573-85.
25. Zalesin KC, Franklin BA, Miller WM, Peterson ED, McCullough PA. Impact of obesity on cardiovascular disease. *The Medical clinics of North America*. 2011;95(5):919-37.
26. National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection E, Treatment of High Blood Cholesterol in A. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002;106(25):3143-421.
27. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose [Internet]. 2007.
28. Gau GT, Wright RS. Pathophysiology, diagnosis, and management of dyslipidemia. *Current problems in cardiology*. 2006;31(7):445-86.

29. Expert Panel on Detection E, Treatment of High Blood Cholesterol in A. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama*. 2001;285(19):2486-97.
30. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement: Executive Summary. *Critical pathways in cardiology*. 2005;4(4):198-203.
31. Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, Boren J. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(7):1225-36.
32. Vaughan CJ, Gotto AM, Jr. Update on statins: 2003. *Circulation*. 2004;110(7):886-92.
33. Rathmann W, Giani G. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care*. 2004;27(10):2568-9; author reply 9.
34. WHO. Diabetes. 2015.
35. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2010;33 Suppl 1:S62-9.
36. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2007;30 Suppl 1:S42-7.
37. Lawrence JM, Imperatore G, Dabelea D, Mayer-Davis EJ, Linder B, Saydah S, et al. Trends in incidence of type 1 diabetes among non-Hispanic white youth in the U.S., 2002-2009. *Diabetes*. 2014;63(11):3938-45.
38. Guariguata L. By the numbers: new estimates from the IDF Diabetes Atlas Update for 2012. *Diabetes research and clinical practice*. 2012;98(3):524-5.
39. Goldstein BJ. Insulin resistance: from benign to type 2 diabetes mellitus. *Reviews in cardiovascular medicine*. 2003;4 Suppl 6:S3-10.
40. Maier W, Holle R, Hunger M, Peters A, Meisinger C, Greiser KH, et al. The impact of regional deprivation and individual socio-economic status on the prevalence of Type 2 diabetes in Germany. A pooled analysis of five population-based studies. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2013;30(3):e78-86.
41. Rathmann W, Scheidt-Nave C, Roden M, Herder C. Type 2 diabetes: prevalence and relevance of genetic and acquired factors for its prediction. *Deutsches Arzteblatt international*. 2013;110(19):331-7.

42. Halban PA, Polonsky KS, Bowden DW, Hawkins MA, Ling C, Mather KJ, et al. beta-cell failure in type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. *Diabetes care*. 2014;37(6):1751-8.
43. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2013;36 Suppl 1:S67-74.
44. Shuman CR, Spratt IL. Office guide to diagnosis and classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes care*. 1981;4(2):335.
45. Cnop M, Landchild MJ, Vidal J, Havel PJ, Knowles NG, Carr DR, et al. The concurrent accumulation of intra-abdominal and subcutaneous fat explains the association between insulin resistance and plasma leptin concentrations : distinct metabolic effects of two fat compartments. *Diabetes*. 2002;51(4):1005-15.
46. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988;37(12):1595-607.
47. Diretrizes Da Sociedade Brasileira De Diabetes: 2013-20142014.
48. Bardini G, Rotella CM, Giannini S. Dyslipidemia and diabetes: reciprocal impact of impaired lipid metabolism and Beta-cell dysfunction on micro- and macrovascular complications. The review of diabetic studies : RDS. 2012;9(2-3):82-93.
49. Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*. 2009;5(3):150-9.
50. Fathallah N, Slim R, Larif S, Hmouda H, Ben Salem C. Drug-Induced Hyperglycaemia and Diabetes. *Drug safety*. 2015.
51. Liu XX, Zhu XM, Miao Q, Ye HY, Zhang ZY, Li YM. Hyperglycemia induced by glucocorticoids in nondiabetic patients: a meta-analysis. *Annals of nutrition & metabolism*. 2014;65(4):324-32.
52. Heisel O, Heisel R, Balshaw R, Keown P. New onset diabetes mellitus in patients receiving calcineurin inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2004;4(4):583-95.
53. Mills EJ, Wu P, Chong G, Ghement I, Singh S, Akl EA, et al. Efficacy and safety of statin treatment for cardiovascular disease: a network meta-analysis of 170,255 patients from 76 randomized trials. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2011;104(2):109-24.
54. Rajpathak SN, Kumbhani DJ, Crandall J, Barzilai N, Alderman M, Ridker PM. Statin therapy and risk of developing type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes care*. 2009;32(10):1924-9.

55. Sattar N, Preiss D, Murray HM, Welsh P, Buckley BM, de Craen AJ, et al. Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials. *Lancet* (London, England). 2010;375(9716):735-42.
56. Preiss D, Sattar N. Statins and the risk of new-onset diabetes: a review of recent evidence. *Current opinion in lipidology*. 2011;22(6):460-6.
57. Zaharan NL, Williams D, Bennett K. Statins and risk of treated incident diabetes in a primary care population. *British journal of clinical pharmacology*. 2013;75(4):1118-24.
58. FDA Drug Safety Communication. Important safety label changes to cholesterol lowering statin drugs 2012. Available from: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm293101.htm>.
59. Chogtu B, Magazine R, Bairy KL. Statin use and risk of diabetes mellitus. *World journal of diabetes*. 2015;6(2):352-7.
60. Navarese EP, Buffon A, Andreotti F, Kozinski M, Welton N, Fabiszak T, et al. Meta-analysis of impact of different types and doses of statins on new-onset diabetes mellitus. *The American journal of cardiology*. 2013;111(8):1123-30.
61. Yamakawa T, Takano T, Tanaka S, Kadonosono K, Terauchi Y. Influence of pitavastatin on glucose tolerance in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2008;15(5):269-75.
62. Carter AA, Gomes T, Camacho X, Juurlink DN, Shah BR, Mamdani MM. Risk of incident diabetes among patients treated with statins: population based study. *BMJ* (Clinical research ed). 2013;346:f2610.
63. Kawai Y, Sato-Ishida R, Motoyama A, Kajinami K. Place of pitavastatin in the statin armamentarium: promising evidence for a role in diabetes mellitus. *Drug design, development and therapy*. 2011;5:283-97.
64. Henriksbo BD, Lau TC, Cavallari JF, Denou E, Chi W, Lally JS, et al. Fluvastatin causes NLRP3 inflammasome-mediated adipose insulin resistance. *Diabetes*. 2014;63(11):3742-7.
65. Nakata M, Nagasaka S, Kusaka I, Matsuoka H, Ishibashi S, Yada T. Effects of statins on the adipocyte maturation and expression of glucose transporter 4 (SLC2A4): implications in glycaemic control. *Diabetologia*. 2006;49(8):1881-92.
66. Goldstein MR, Mascitelli L. Do statins cause diabetes? *Current diabetes reports*. 2013;13(3):381-90.
67. Sampson UK, Linton MF, Fazio S. Are statins diabetogenic? *Current opinion in cardiology*. 2011;26(4):342-7.

68. Xia F, Xie L, Mihic A, Gao X, Chen Y, Gaisano HY, et al. Inhibition of cholesterol biosynthesis impairs insulin secretion and voltage-gated calcium channel function in pancreatic beta-cells. *Endocrinology*. 2008;149(10):5136-45.
69. Mabuchi H, Higashikata T, Kawashiri M, Katsuda S, Mizuno M, Nohara A, et al. Reduction of serum ubiquinol-10 and ubiquinone-10 levels by atorvastatin in hypercholesterolemic patients. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2005;12(2):111-9.
70. Parker BA, Thompson PD. Effect of statins on skeletal muscle: exercise, myopathy, and muscle outcomes. *Exercise and sport sciences reviews*. 2012;40(4):188-94.
71. Deichmann R, Lavie C, Andrews S. Coenzyme q10 and statin-induced mitochondrial dysfunction. *The Ochsner journal*. 2010;10(1):16-21.
72. Chamberlain LH. Inhibition of isoprenoid biosynthesis causes insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS letters*. 2001;507(3):357-61.
73. Brault M, Ray J, Gomez YH, Mantzoros CS, Daskalopoulou SS. Statin treatment and new-onset diabetes: a review of proposed mechanisms. *Metabolism: clinical and experimental*. 2014;63(6):735-45.
74. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*. 2010;90(3):859-904.
75. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*. 2006;7(7):688-93.
76. Xu J, Gordon JI. Honor thy symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(18):10452-9.
77. Human Microbiome Project C. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486(7402):207-14.
78. 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.
79. Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X, et al. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *The ISME journal*. 2011;5(2):220-30.
80. Wostmann BS. The germfree animal in nutritional studies. *Annual review of nutrition*. 1981;1:257-79.
81. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet (London, England)*. 2003;361(9356):512-9.
82. Delzenne NM, Cani PD. Interaction between obesity and the gut microbiota: relevance in nutrition. *Annual review of nutrition*. 2011;31:15-31.

83. Delzenne NM, Neyrinck AM, Backhed F, Cani PD. Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nature reviews Endocrinology*. 2011;7(11):639-46.
84. The Ribosomal Database Project (RDP) 2014. Available from: <http://rdp.cme.msu.edu/>.
85. Frank DN, Pace NR. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Current opinion in gastroenterology*. 2008;24(1):4-10.
86. Robles Alonso V, Guarner F. Linking the gut microbiota to human health. *The British journal of nutrition*. 2013;109 Suppl 2:S21-6.
87. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature*. 2007;449(7164):804-10.
88. Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & biology*. 1998;5(10):R245-9.
89. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59-65.
90. Benson AK, Kelly SA, Legge R, Ma F, Low SJ, Kim J, et al. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(44):18933-8.
91. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011;473(7346):174-80.
92. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308(5728):1635-8.
93. Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological research*. 2013;69(1):52-60.
94. Sommer F, Backhed F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nature reviews Microbiology*. 2013;11(4):227-38.
95. Modi SR, Collins JJ, Relman DA. Antibiotics and the gut microbiota. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(10):4212-8.
96. Everard A, Cani PD. Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2013;27(1):73-83.
97. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(44):15718-23.

98. Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(3):979-84.
99. 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.
100. Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen YY, et al. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*. 2009;137(5):1716-24 e1-2.
101. 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.
102. 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.
103. Kootte RS, Vrieze A, Holleman F, Dallinga-Thie GM, Zoetendal EG, de Vos WM, et al. The therapeutic potential of manipulating gut microbiota in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2012;14(2):112-20.
104. Delzenne NM, Cani PD. Gut microbiota and the pathogenesis of insulin resistance. *Current diabetes reports*. 2011;11(3):154-9.
105. Membrez M, Blancher F, Jaquet M, Bibiloni R, Cani PD, Burcelin RG, et al. Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2008;22(7):2416-26.
106. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444(7121):840-6.
107. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022-3.
108. 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.
109. Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell host & microbe*. 2008;3(4):213-23.

110. 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.
111. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009;457(7228):480-4.
112. 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.
113. 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. *Current microbiology*. 2010;61(1):69-78.
114. Schwartz A, Taras D, Schafer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity*. 2010;18(1):190-5.
115. Duncan SH, Belenguer A, Holtrop G, Johnstone AM, Flint HJ, Lobley GE. Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Applied and environmental microbiology*. 2007;73(4):1073-8.
116. Tilg H, Kaser A. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(6):2126-32.
117. Tremaroli V, Backhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*. 2012;489(7415):242-9.
118. 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.
119. 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.
120. Liou AP, Paziuk M, Luevano JM, Jr., Machineni S, Turnbaugh PJ, Kaplan LM. Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity. *Science translational medicine*. 2013;5(178):178ra41.
121. Panwar H, Rashmi HM, Batish VK, Grover S. Probiotics as potential biotherapeutics in the management of type 2 diabetes - prospects and perspectives. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2013;29(2):103-12.
122. Perez-Cobas AE, Gosalbes MJ, Friedrichs A, Knecht H, Artacho A, Eismann K, et al. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. *Gut*. 2013;62(11):1591-601.
123. Panda S, El khader I, Casellas F, Lopez Vivancos J, Garcia Cors M, Santiago A, et al. Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota. *PloS one*. 2014;9(4):e95476.

124. De La Cochetiere MF, Durand T, Lepage P, Bourreille A, Galmiche JP, Dore J. Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(11):5588-92.
125. Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS biology*. 2008;6(11):e280.
126. Raymond F, Ouameur AA, Deraspe M, Iqbal N, Gingras H, Dridi B, et al. The initial state of the human gut microbiome determines its reshaping by antibiotics. *The ISME journal*. 2016;10(3):707-20.
127. Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108 Suppl 1:4554-61.
128. Francino MP. Antibiotics and the Human Gut Microbiome: Dysbioses and Accumulation of Resistances. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:1543.
129. Mikkelsen KH, Frost M, Bahl MI, Licht TR, Jensen US, Rosenberg J, et al. Effect of Antibiotics on Gut Microbiota, Gut Hormones and Glucose Metabolism. *PloS one*. 2015;10(11):e0142352.
130. Rodrigues RR, Greer RL, Dong X, KN DS, Gurung M, Wu JY, et al. Antibiotic-Induced Alterations in Gut Microbiota Are Associated with Changes in Glucose Metabolism in Healthy Mice. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:2306.
131. Hwang I, Park YJ, Kim YR, Kim YN, Ka S, Lee HY, et al. Alteration of gut microbiota by vancomycin and bacitracin improves insulin resistance via glucagon-like peptide 1 in diet-induced obesity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2015;29(6):2397-411.
132. Ouwerkerk JP, Aalvink S, Belzer C, De Vos WM. Preparation and preservation of viable *Akkermansia muciniphila* cells for therapeutic interventions. *Beneficial microbes*. 2017;8(2):163-9.
133. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(22):9066-71.
134. 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.
135. Moreno-Indias I, Cardona F, Tinahones FJ, Queipo-Ortuno MI. Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:190.
136. Kaddurah-Daouk R, Baillie RA, Zhu H, Zeng ZB, Wiest MM, Nguyen UT, et al. Enteric microbiome metabolites correlate with response to simvastatin treatment. *PloS one*. 2011;6(10):e25482.

137. Caparros-Martin JA, Lareu RR, Ramsay JP, Peplies J, Reen FJ, Headlam HA, et al. Statin therapy causes gut dysbiosis in mice through a PXR-dependent mechanism. *Microbiome*. 2017;5(1):95.
138. Nolan JA, Skuse P, Govindarajan K, Patterson E, Konstantinidou N, Casey PG, et al. The influence of rosuvastatin on the gastrointestinal microbiota and host gene expression profiles. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2017;312(5):G488-G97.
139. Fafalios A, Ma J, Tan X, Stoops J, Luo J, Defrances MC, et al. A hepatocyte growth factor receptor (Met)-insulin receptor hybrid governs hepatic glucose metabolism. *Nature medicine*. 2011;17(12):1577-84.
140. Zhang N, Huan Y, Huang H, Song GM, Sun SJ, Shen ZF. Atorvastatin improves insulin sensitivity in mice with obesity induced by monosodium glutamate. *Acta pharmacologica Sinica*. 2010;31(1):35-42.
141. Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss CA, Maza O, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*. 2014;514(7521):181-6.
142. Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*. 2001;292(5519):1160-4.
143. Ridker PM, Pradhan A, MacFadyen JG, Libby P, Glynn RJ. Cardiovascular benefits and diabetes risks of statin therapy in primary prevention: an analysis from the JUPITER trial. *Lancet (London, England)*. 2012;380(9841):565-71.
144. Waters DD, Ho JE, DeMicco DA, Breazna A, Arsenault BJ, Wun CC, et al. Predictors of new-onset diabetes in patients treated with atorvastatin: results from 3 large randomized clinical trials. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;57(14):1535-45.
145. Kanda M, Satoh K, Ichihara K. Effects of atorvastatin and pravastatin on glucose tolerance in diabetic rats mildly induced by streptozotocin. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2003;26(12):1681-4.
146. Suzuki M, Kakuta H, Takahashi A, Shimano H, Tada-lida K, Yokoo T, et al. Effects of atorvastatin on glucose metabolism and insulin resistance in KK/Ay mice. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2005;12(2):77-84.
147. Preiss D, Seshasai SR, Welsh P, Murphy SA, Ho JE, Waters DD, et al. Risk of incident diabetes with intensive-dose compared with moderate-dose statin therapy: a meta-analysis. *Jama*. 2011;305(24):2556-64.
148. Koh KK, Quon MJ, Han SH, Lee Y, Kim SJ, Shin EK. Atorvastatin causes insulin resistance and increases ambient glycemia in hypercholesterolemic patients. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;55(12):1209-16.

149. Parida S, Swain TR, Routray SN, Maiti R. Effect of Atorvastatin on Glycaemic Parameters in Normoglycaemic and Prediabetic Subjects: A Prospective, Panel Study. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2017;11(2):FC04-FC9.
150. Lee S, Lee Y, Kim J, An J, Kim K, Lee H, et al. Atorvastatin and rosuvastatin improve physiological parameters and alleviate immune dysfunction in metabolic disorders. *Biochemical and biophysical research communications*. 2016;478(3):1242-7.
151. Bruder-Nascimento T, Callera GE, Montezano AC, He Y, Antunes TT, Nguyen Dinh Cat A, et al. Vascular injury in diabetic db/db mice is ameliorated by atorvastatin: role of Rac1/2-sensitive Nox-dependent pathways. *Clinical science*. 2015;128(7):411-23.
152. Takagi T, Matsuda M, Abe M, Kobayashi H, Fukuhara A, Komuro R, et al. Effect of pravastatin on the development of diabetes and adiponectin production. *Atherosclerosis*. 2008;196(1):114-21.
153. Kanno H, Iwai M, Inaba S, Senba I, Nakaoka H, Sone H, et al. Improvement of glucose intolerance by combination of pravastatin and olmesartan in type II diabetic KK-A(y) mice. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2009;32(8):706-11.
154. Sun B, Zhong Z, Wang F, Xu J, Xu F, Kong W, et al. Atorvastatin impaired glucose metabolism in C2C12 cells partly via inhibiting cholesterol-dependent glucose transporter 4 translocation. *Biochemical pharmacology*. 2018;150:108-19.
155. Takaguri A, Satoh K, Itagaki M, Tokumitsu Y, Ichihara K. Effects of atorvastatin and pravastatin on signal transduction related to glucose uptake in 3T3L1 adipocytes. *Journal of pharmacological sciences*. 2008;107(1):80-9.
156. Gruzdeva O, Uchasova E, Dyleva Y, Akbasheva O, Karetnikova V, Shilov A, et al. Effect of different doses of statins on the development of type 2 diabetes mellitus in patients with myocardial infarction. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*. 2017;10:481-9.
157. Madhu SV, Aslam M, Galav V, Bhattacharya SK, Jafri AA. Atorvastatin prevents type 2 diabetes mellitus--an experimental study. *European journal of pharmacology*. 2014;728:135-40.
158. Moon GJ, Kim SJ, Cho YH, Ryoo S, Bang OY. Antioxidant effects of statins in patients with atherosclerotic cerebrovascular disease. *Journal of clinical neurology*. 2014;10(2):140-7.
159. Ichida Y, Hasegawa G, Fukui M, Obayashi H, Ohta M, Fujinami A, et al. Effect of atorvastatin on in vitro expression of resistin in adipocytes and monocytes/macrophages and effect of atorvastatin treatment on serum resistin levels in patients with type 2 diabetes. *Pharmacology*. 2006;76(1):34-9.
160. Gao X, Nan Y, Zhao Y, Yuan Y, Ren B, Sun C, et al. Atorvastatin reduces lipid accumulation in the liver by activating protein kinase A-mediated phosphorylation of perilipin 5. *Biochimica et biophysica acta*. 2017;1862(12):1512-9.

161. Ajamieh H, Farrell G, Wong HJ, Yu J, Chu E, Chen J, et al. Atorvastatin protects obese mice against hepatic ischemia-reperfusion injury by Toll-like receptor-4 suppression and endothelial nitric oxide synthase activation. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2012;27(8):1353-61.
162. Ekstedt M, Franzen LE, Mathiesen UL, Holmqvist M, Bodemar G, Kechagias S. Statins in non-alcoholic fatty liver disease and chronically elevated liver enzymes: a histopathological follow-up study. *Journal of hepatology*. 2007;47(1):135-41.
163. Rallidis LS, Drakoulis CK, Parasi AS. Pravastatin in patients with nonalcoholic steatohepatitis: results of a pilot study. *Atherosclerosis*. 2004;174(1):193-6.
164. de Keyser CE, Koehler EM, Schouten JN, Visser LE, Hofman A, Janssen HL, et al. Statin therapy is associated with a reduced risk of non-alcoholic fatty liver in overweight individuals. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2014;46(8):720-5.
165. Park HS, Jang JE, Ko MS, Woo SH, Kim BJ, Kim HS, et al. Statins Increase Mitochondrial and Peroxisomal Fatty Acid Oxidation in the Liver and Prevent Non-Alcoholic Steatohepatitis in Mice. *Diabetes & metabolism journal*. 2016;40(5):376-85.
166. Greenhill C. Gut microbiota: Firmicutes and Bacteroidetes involved in insulin resistance by mediating levels of glucagon-like peptide 1. *Nature reviews Endocrinology*. 2015;11(5):254.
167. Hori S, Kizu J, Kawamura M. Effect of fluoroquinolones on plasma glucose levels in fasted and glucose-loaded mice. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2006;12(2):109-11.
168. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(31):11070-5.
169. Ciubotaru I, Green SJ, Kukreja S, Barengolts E. Significant differences in fecal microbiota are associated with various stages of glucose tolerance in African American male veterans. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2015;166(5):401-11.
170. 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.
171. Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L, et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nature medicine*. 2017;23(1):107-13.



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 10 de dezembro de 2015.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"EFEITO DE ESTATINAS SOBRE O PERFIL GLICÊMICO E A MICROBIOTA INTESTINAL EM CAMUNDONGOS OBESOS E DIABÉTICOS OB/OB"**, UnBDoC n.º 135663/2015, sob responsabilidade do Professor Francisco de Assis Rocha Neves foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Mus musculus*:
30. A presente aprovação é válida pelo período de 01/10/2015 a 01/12/2017.

Prof. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.