

REVISÃO

Translational research into gut microbiota: new horizons in obesity treatment

Pesquisa translacional em microbiota intestinal: novos horizontes no tratamento da obesidade

Daniela M. Tsukumo; Bruno M. Carvalho; Marco A. Carvalho-Filho; Mário J. A. Saad

Disciplina de Medicina Interna, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM-Unicamp), Campinas, SP, Brasil

RESUMO

A obesidade é uma pandemia que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Quando uma população é submetida ao mesmo estresse nutricional, alguns indivíduos são menos suscetíveis ao ganho de peso induzido pela dieta e à hiperglicemia. Essa observação sugere que outros mecanismos não diretamente relacionados ao genoma humano estejam envolvidos. O intestino humano é colonizado por milhões de bactérias, que coletivamente constituem a flora comensal normal. A evidência de que a composição da flora intestinal pode ser diferente em humanos magros e obesos levou à especulação de que a flora intestinal pode participar na fisiopatologia da obesidade. Diferentes mecanismos foram propostos para tentar explicar a correlação entre flora intestinal e obesidade. O primeiro mecanismo consiste no papel da flora intestinal na extração de energia de polissacarídeos não digeríveis. O segundo mecanismo envolve a modulação dos níveis de lipopolissacarídeos pela flora intestinal, o que desencadeia uma inflamação crônica subclínica que acarreta obesidade e diabetes. Um terceiro mecanismo propõe que a flora intestinal pode induzir a regulação de genes do hospedeiro que modulam como a energia é gasta e armazenada. Entretanto, estudos adicionais são necessários para estabelecer o papel da flora intestinal no desenvolvimento da obesidade.

Descritores: Obesidade; flora intestinal; extração de energia; lipopolissacarídeos

INTRODUÇÃO

A obesidade está aumentando e se tornando uma pandemia que se desenvolveu rapidamente nas últimas três décadas (1). A obesidade resulta de alterações na regulação dos processos orgânicos relacionados à ingestão, consumo e armazenamento energético. Um aumento na ingestão de alimentos altamente energéticos, especialmente combinada com a redução da

atividade física, certamente contribui para a alta prevalência de obesidade (2). No entanto, quando uma população é submetida ao mesmo estresse nutricional, alguns indivíduos são menos suscetíveis ao ganho de peso induzido pela dieta e hiperglicemia (3,4). Esta observação sugere que outros mecanismos estão envolvidos, não diretamente relacionados com o genoma humano.

O intestino humano contém um número imenso de microrganismos, conhecidos coletivamente como microbiota. Esta comunidade é dominada por bactérias anaeróbias e inclui aproximadamente 500 a 1.000 espécies nas quais se estima que os genomas coletivos contenham 100 vezes mais genes do que nosso próprio genoma humano (5,6). Nossa microbiota intestinal pode ser retratada como um órgão microbiano que contribui para a nossa homeostase (7); suas funções são múltiplas e extremamente diversificadas.

Recentemente, tem sido demonstrado que a microbiota intestinal afeta o armazenamento de gordura e a captação de energia (8), o que sugere que os microrganismos intestinais podem desempenhar um papel direto no desenvolvimento da obesidade. Neste artigo, revisamos as evidências que apóiam o papel potencial da microbiota intestinal no desenvolvimento da obesidade.

MICROBIOTA INTESTINAL NORMAL

Bactérias comensais estão presentes em grande número no trato gastrointestinal. As bactérias residentes superam as células somáticas e germinativas humanas em dez vezes e, representam um genoma microbiano combinado, bem acima do genoma humano (9).

As secreções gástricas, pancreáticas e de ácidos biliares impedem a colonização do estômago e do intestino delgado proximal pela maioria das bactérias. O cólon é colonizado com cerca de 10^{12} organismos/g de conteúdo intestinal (Figura 1). Recentemente, foi demonstrado que *Bacteroidetes* e *Firmicutes* representam mais de 90% de todos os filotipos das bactérias. Mais de 90% da população bacteriana são anaeróbios estritos, sendo as espécies predominantes: *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, entre outros.

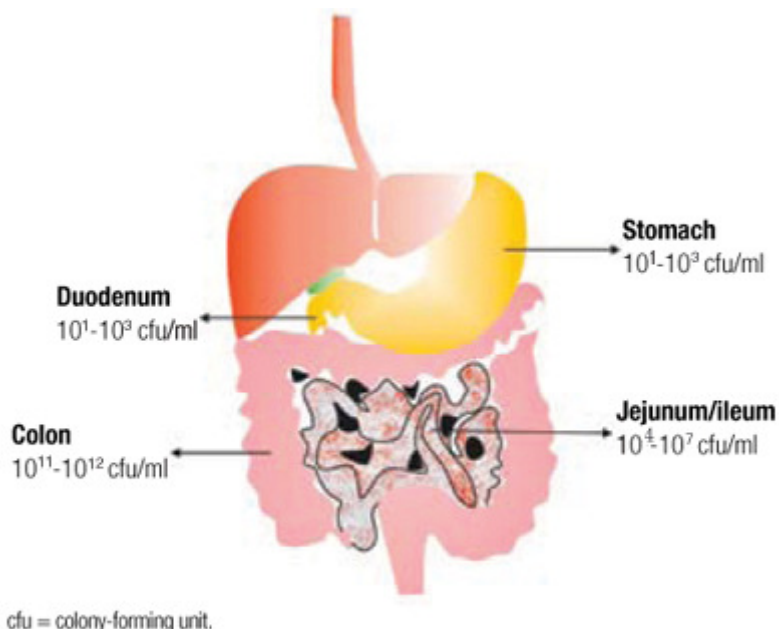


Figure 1. Relative concentrations of bacteria at various locations within the gut.

A microbiota intestinal desempenha um papel importante na função normal do intestino e manutenção da saúde do hospedeiro. Os benefícios das bactérias comensais são bem conhecidos: ajudam a digerir a celulose e salvar energia, e formam uma barreira natural de defesa que é considerada essencial para o desenvolvimento e maturação dos sistemas imune da mucosa e sistêmico. A microbiota intestinal é composta de bactérias potencialmente patogênicas, além de inúmeros microrganismos não patogênicos promotores da saúde.

Apesar de nossa compreensão limitada sobre a composição da microbiota intestinal nativa, a evidência sugere que é estabelecida no primeiro ano de vida. O intestino fetal é estéril, mas a colonização começa imediatamente após o nascimento e é influenciada pelo tipo de parto, pela dieta infantil, pelos níveis de higiene e uso de medicamentos (10). A colonização intestinal começa no momento do parto, quando a criança está exposta a flora vaginal materna, bactérias fecais e bactérias do ambiente, e é provável que continue para além do período perinatal, pelo menos até 12-24 meses de idade, antes do estabelecimento de uma flora original estável (11-13). Estudos têm mostrado que o tipo de parto adotado pode ter influência. Bebês nascidos de parto vaginal tem colonização inicial de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, enquanto que as crianças que nascem por parto cesárea podem ter um atraso de até 30 dias na colonização com estes organismos benéficos (10).

Como indicado acima, a montagem da microbiota do intestino começa no nascimento, mas sua composição vai sofrer mudanças drásticas durante o desenvolvimento pós-natal. A dieta é, claramente, um fator chave que regula a sequência e a natureza da colonização. Enterobactérias e bifidobactérias representam os primeiros colonizadores, embora diferenças na composição da flora intestinal ocorram entre crianças amamentadas no peito e com fórmulas infantis (14). Em lactentes, alimentados com leite materno, *Bifidobacterium* é o organismo primário e a microflora produz quantidades elevadas de acetato e lactato que restringe o crescimento de patógenos potenciais tais *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*. Além disso, a colonização é afetada pela idade gestacional. Prematuros internados na unidade neonatal de cuidados intensivos experimentam uma colonização tardia, com um número limitado de espécies bacterianas, que tendem a ser mais virulentas (15,16).

Embora a composição da microbiota varie ao longo do comprimento do intestino e durante a vida do hospedeiro, é bastante estável durante a maior parte da vida humana normal. A transformação da microbiota tipo -adulto é provavelmente desencadeada por múltiplos fatores do hospedeiro e fatores externos (17,18), incluindo os efeitos da própria microbiota, o desenvolvimento de mudanças no ambiente intestinal, e a transição para uma dieta adulta.

Um número limitado de estudos tem indicado que a microflora colônica sofre alterações com o envelhecimento. As principais diferenças microbiológicas entre adultos e idosos foram a ocorrência de maior número de enterobactérias e um menor número de populações de anaeróbios no grupo de idosos (19). Espécies de bifidobactérias, que são vistos como sendo de proteção, diminuem drasticamente com a idade, enquanto clostrídios e enterobactérias, que são vistos como prejudiciais para a saúde, aumentam (20,21).

A microflora intestinal de uma pessoa pode diferir significativamente de outra e estudos comparativos entre adultos com diferentes graus de parentesco têm demonstrado que o genótipo do hospedeiro é mais importante do que a dieta, a idade e o tempo de vida, na determinação da composição da microbiota intestinal (19,22).

Estudos com camundongos *germ-free* (isentos de germes) têm demonstrado que a flora intestinal é fundamental para a manutenção da função gastrointestinal normal, função imune e digestão adequada de nutrientes. Animais *germ-free* são mais suscetíveis à infecção e apresentam redução da: vascularização, atividade de enzimas digestivas, espessura da parede muscular, produção de citocinas, tecido linfóide associado à mucosa (MALT), motilidade e níveis séricos de imunoglobulinas (9).

MICROBIOTA INTESTINAL E OBESIDADE

Extração de energia adicional dos alimentos ingeridos

Devido à epidemia mundial de obesidade, há grande interesse em como as interações entre o ser humano e a microbiota intestinal podem contribuir para o desenvolvimento da obesidade. Evidências recentes sugerem que os trilhões de bactérias que normalmente residem no intestino humano afetam a aquisição de nutrientes e a regulação energética. Além disso, lipopolissacarídeos bacterianos provenientes da microbiota intestinal podem atuar como um fator desencadeante, interligando inflamação à obesidade induzida pelo alto teor de gordura na dieta (Figura 2).

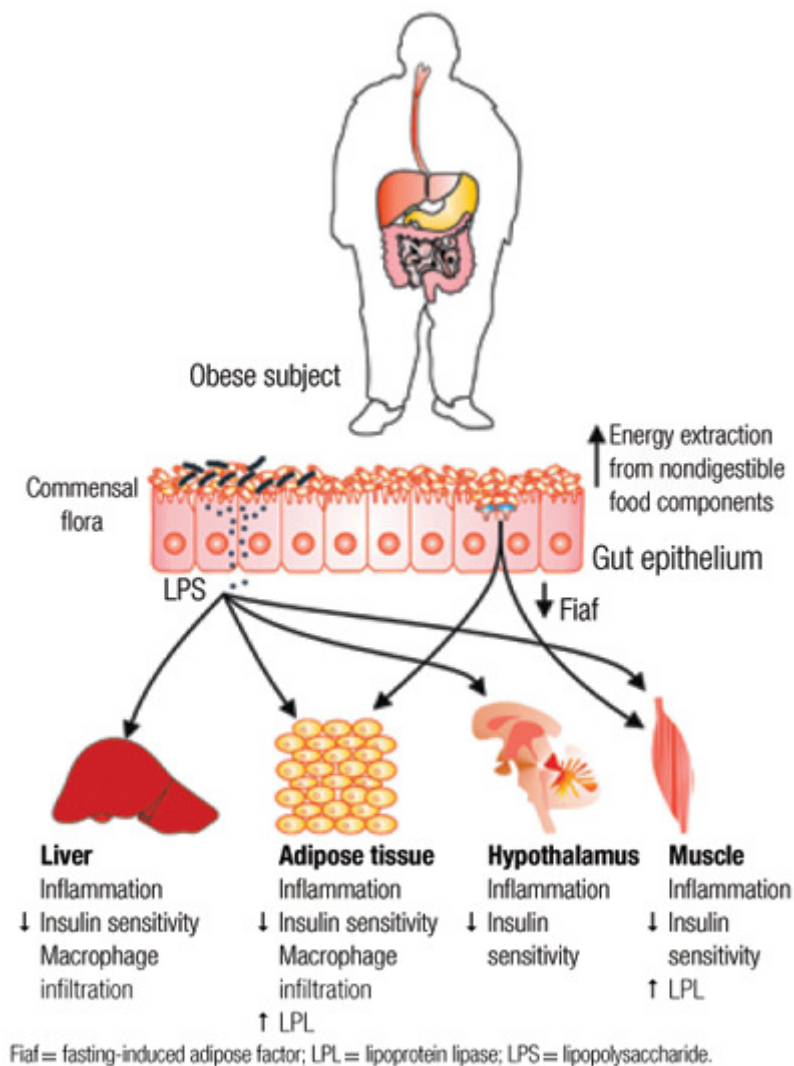


Figure 2. Schematic view of the possible mechanisms linking gut flora to obesity.

Backhed e cols. demonstraram que camundongos criados convencionalmente têm um maior conteúdo de gordura corporal do que os *germ-free*, apesar de consumirem menos comida do que suas contrapartes livres de germes (23). Na mesma linha, posteriormente, se mostrou que a colonização de ratos *germ-free* (sem germes) com uma microbiota de ratos obesos, resultou em um aumento significativamente maior na gordura corporal total, quando comparado com animais colonizados por microbiota de ratos magros (24). Este estudo também caracterizou os

microbiomas do intestino distal dos camundongos obesos, deficientes de leptina (ob / ob) e dos camundongos magros (ob / + e + / +) e verificou que os ratos obesos têm uma maior proporção intestinal de de bactérias do filo Firmicutes e uma redução correspondente no número de bactérias do filo Bacteroidetes. Esses pesquisadores mostraram que a microbiota de ratos obesos era rica em genes que codificam enzimas que quebram/digerem polissacarídeos não digeríveis. Eles também encontraram maior quantidade de produtos finais de fermentação e menor teor de calorias/energia nas fezes dos ratos obesos, levando-os a especular que a microbiota intestinal nestes ratos facilitou a extração de calorias/energia dos alimentos ingeridos.

Ley e cols. também demonstraram que a obesidade pode estar associada a microflora intestinal alterada em um modelo animal (25). A comparação da microbiota do intestino de camundongos ob / ob versus camundongos magros, mostrou que a abundância relativa dos Bacteroidetes nos camundongos ob / ob (obesos) foi 50% menor, enquanto que a dos Firmicutes foi 50% maior (Figura 3). Em humanos obesos, a mesma equipe de pesquisadores relataram uma diminuição na proporção relativa de Bacteroidetes quando comparados aos indivíduos magros (26). Além disso, quando os pacientes obesos perderam peso durante um período de um ano, a proporção de Firmicutes tornou-se semelhante à das pessoas magras.

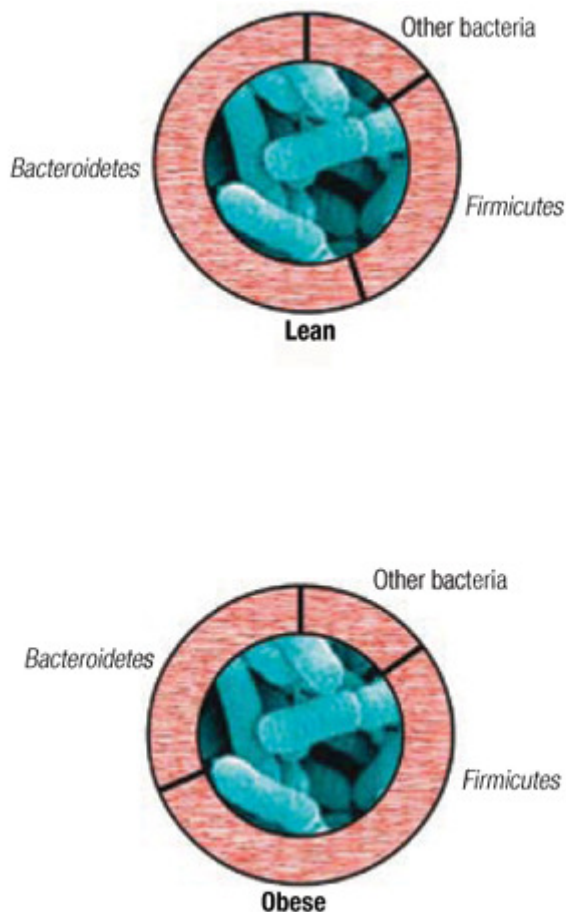


Figure 3. Relative proportion of firmicutes and bacteroidetes in lean and obese mice.

Mais estudos são necessários para esclarecer uma série de questões ligadas à relação entre a microbiota intestinal e a obesidade. Não está claro se o pequeno aumento da extração de energia pode realmente levar a um ganho significativo de peso em um curto período de tempo, como sugerido nos estudos de transplante da flora intestinal. Além disso, tem sido relatado em outros estudos que uma dieta rica em fibras diminui o peso corporal, a massa gorda e a gravidade do diabetes (27,28).

De forma adicional, questões importantes permanecem sem resposta. A primeira é o porquê e como a composição da microbiota é alterada por diferenças no peso corporal. Se um organismo hospedeiro apresenta a capacidade de alterar a sua microbiota, de modo a aumentar a extração energética, afigura-se mais adaptável a fazê-lo quando enfrenta condições de fome e perda de peso. No entanto, exatamente o oposto foi demonstrado, ou seja, a microbiota parece ser mais eficaz em seres humanos obesos que já têm o máximo de energia armazenada (26). Além disso, há também a questão de como as condições do organismo hospedeiro poderiam alterar a composição da microbiota.

Indução de inflamação subclínica

Recentemente, têm sido proposto uma nova hipótese que liga a microbiota intestinal com a homeostase metabólica (Figura 2). Com base nas demonstrações recentes, que a obesidade e o diabetes tipo 2 estão associados com baixo grau de inflamação crônica sistêmica (29-33) no fígado, tecido adiposo e hipotálamo, Cani e cols. (34) formularam a hipótese de que os lipopolissacarídeos bacterianos (LPSs) derivados de bactérias gram-negativas que residem na microbiota intestinal, agem como um fator desencadeante, interligando a inflamação com o alto teor de gordura da dieta e indução do diabetes e obesidade. Eles descobriram que a dieta rica em gordura resultou em uma modulação significativa da população de bactérias dominantes no interior da microbiota intestinal. A redução do número de bifidobactérias, do grupo *Eubacterium rectal-Clostridium coccoides* e *Bacteroides*, favorecendo um aumento na razão de gram-negativos para gram-positivos. Essa modulação da microflora intestinal foi associada com um aumento significativo nos lipopolissacarídeos plasmáticos, na massa de gordura, no ganho de peso corporal, no acúmulo de triglicérides no fígado, na resistência à insulina e diabetes. Outro estudo mostrou que ratos tratados com polimixina B, um antibiótico de espectro específico para gram-negativos, apresentaram reduzida expressão de LPSs e esteatose hepática (35).

Estudos em humanos têm apoiado estas conclusões. Comparando-se dois grupos de mesma idade, um diabético e outro sem diabetes, apurou-se que os níveis de LPSs no plasma foram significativamente mais elevados nos pacientes diabéticos (36). Este estudo reforçou a hipótese de que os lipopolissacarídeos podem atuar como um fator relacionado a microbiota intestinal, envolvido no desenvolvimento do diabetes tipo 2 e obesidade em seres humanos.

Um estudo mais recente mostrou que a modificação da microbiota do intestino por dois antibióticos, norfloxacin e ampicilina, melhorou a tolerância oral à glicose e reduziu a esteatose hepática em camundongos ob / ob (37). Cani e cols. (38) também demonstraram que a modulação da microbiota intestinal por meio do tratamento com antibiótico reduz os níveis plasmáticos de LPSs, a permeabilidade do intestino, e a ocorrência de inflamação do tecido adiposo visceral e infiltração de macrófagos, em ratos alimentados com alto teor de gordura. Este efeito foi correlacionado com redução da intolerância à glicose e do ganho de peso.

Regulação dos genes do hospedeiro que regulam o gasto e armazenamento energético

Como descrito acima, foi recentemente demonstrado que os ratos do grupo controle têm um teor de gordura corporal 40% maior e de gordura gonadal ~ 50% maior que os ratos *germ-free* (23). Neste estudo, quando a microbiota do intestino distal dos ratos normais, foi transplantada para os ratos gnotobióticos, houve um aumento de 60% na gordura corporal no prazo de 2 semanas. Para esclarecer os possíveis mecanismos deste efeito, os autores mostraram que a

microbiota promoveu a absorção de monossacarídeos a partir do intestino e induziu a lipogênese hepática no hospedeiro, respostas estas mediadas por duas proteínas: ChREBP - *proteína de ligação ao elemento de resposta aos carboidratos* e SREBP-1 – *proteína de ligação ao elemento de resposta ao esterol* (23).

Em um experimento interessante, usando camundongos geneticamente modificados (quebra do FIAF - *fator adipocitário induzido pelo jejum*), os autores mostraram que os microrganismos do intestino suprimem o FIAF intestinal, também conhecido como proteína 4 tipo angiopoietina (Figura 2). O jejum induzido inibe nos adipócitos a atividade da lipase lipoprotéica, catalisando assim, a liberação de ácidos graxos a partir de triacilgliceróis das lipoproteínas, que são então levados ao músculo e tecido adiposo. No estudo, a supressão do FIAF (*fator adipocitário induzido pelo jejum*) resultou em aumento da atividade da lipase lipoprotéica nos adipócitos e promoveu o armazenamento de energia como gordura, levando os autores a postular que a regulação energética pela microbiota intestinal ocorre através de pelo menos três mecanismos microbianos inter-relacionados: a) fermentação de polissacarídeos não digeríveis até formas absorvíveis; b) a absorção intestinal de monossacarídeos e ácidos graxos de cadeia curta, com sua posterior conversão em gordura no fígado e, c) a regulação de genes do hospedeiro que promovem a deposição de gordura nos lipócitos (23).

Além disso, Backhed e cols. (39) investigaram o(s) mecanismo(s) de resistência subjacente à obesidade em camundongos *germ-free*. Estudaram camundongos *germ-free* (isentos de germes) alimentados com uma dieta rica em gordura e rica em açúcar. Eles definiram que os animais *germ-free* ficaram protegidos da obesidade induzida pela dieta, por dois mecanismos complementares, mas independentes, que resultam em aumento do metabolismo dos ácidos graxos: (1) níveis elevados de FIAF desencadeando a produção de co-ativador do receptor ativado por proliferadores de peroxoma gama, que é conhecido por aumentar a expressão dos genes que codificam reguladores da oxidação mitocondrial de ácidos graxos, e (2) aumento da atividade da AMPK (*adenosina-proteína quinase ativada*), uma enzima que monitora o *status* de energia celular. Estes resultados sugerem que a microbiota intestinal pode afetar ambos os lados da equação de balanço energético, influenciando o aproveitamento de energia a partir de substâncias alimentares (FIAF) e afetando os genes que regulam o modo como a energia é gasta e armazenada.

CONCLUSÃO

A evidência de que a composição da microbiota intestinal pode variar entre indivíduos magros e obesos levou à especulação de que a microbiota intestinal pode participar na fisiopatologia da obesidade. Diferentes mecanismos têm sido propostos para explicar a ligação entre a flora intestinal e a obesidade. O primeiro mecanismo consiste no papel da microbiota intestinal na extração de energia a partir de polissacarídeos não digeríveis. A segunda, consiste no papel modulador da microbiota intestinal, dos níveis plasmáticos de LPSs, que desencadeiam a inflamação crônica sistêmica de baixo grau, que causa a obesidade e diabetes. Um terceiro mecanismo propõe que a microbiota intestinal pode induzir a regulação de genes do hospedeiro que modulam como a energia é gasta e armazenada. No entanto, muitas perguntas ainda estão sem resposta. Em primeiro lugar, não está claro se as pequenas mudanças na extração energética podem realmente levar a diferenças significativas no peso corporal. Além disso, é essencial comprovar se as diferenças observadas na microbiota intestinal de pessoas obesas são causa ou consequência da obesidade.

O intestino humano é mais densamente povoado com microrganismos que qualquer outro órgão e a manipulação da microbiota intestinal pode representar uma nova abordagem para o tratamento da obesidade. No entanto, o papel dos prebióticos, probióticos e antibióticos na modulação da microbiota intestinal na obesidade é desconhecido. Os probióticos são organismos vivos que são freqüentemente usados como reguladores dietéticos para influenciar a composição da microbiota intestinal. Os prebióticos são oligossacarídeos não digeríveis que são fermentados pela microbiota intestinal favorecendo o crescimento de microrganismos comensais benéficos. No futuro, prebióticos, probióticos e antibióticos poderão ser usados para modular a flora intestinal e, talvez, eles terão um papel importante no tratamento da obesidade e suas complicações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hill JO, Wyatt HR, Reed GW, Peters JC. Obesity and the environment: where do we go from here? *Science*. 2003;299(5608):853-5.
2. Hill JO. Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. *Endocr Rev*. 2006;27(7):750-61.
3. Levin BE, Keeseey RE. Defense of differing body weight set points in diet-induced obese and resistant rats. *Am J Physiol*. 1998;274(2 Pt 2):R412-9.
4. Tappy L. Metabolic consequences of overfeeding in humans. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004;7(6):623-8.
5. Xu J, Gordon JL. Inaugural Article: Honor thy symbionts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(18):10452-9.
6. Cani PD, Delzenne NM. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007;10(6):729-34.
7. Bocci V. The neglected organ: bacterial flora has a crucial immunostimulatory role. *Perspect Biol Med*. 1992;35(2):251-60.
8. DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA, Rittmann BE. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(4):460-9.
9. Shanahan F. The host-microbe interface within the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2002;16(6):915-31.
10. Gronlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999;28(1):19-25.
11. Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans AD. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(1):219-26.
12. Midtvedt AC, Midtvedt T. Production of short chain fatty acids by the intestinal microflora during the first 2 years of human life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1992;15(4):395-403.
13. Zoetendal EG, Akkermans AD, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64(10):3854-9.
14. Mountzouris KC, McCartney AL, Gibson GR. Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation. *Br J Nutr*. 2002;87(5):405-20.
15. Kosloske AM. Epidemiology of necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr Suppl*. 1994;396:2-7.
16. Orrhage K, Nord CE. Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants. *Acta Paediatr Suppl*. 1999;88(430):47-57.
17. Gorbach SL. Intestinal microflora. *Gastroenterology*. 1971;60(6):1110-29.
18. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr*. 1999;69(5):1035S-1045S.
19. Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut*. 2001;48(2):198-205.
20. Gorbach SL, Nahas L, Lerner PI, Weinstein L. Studies of intestinal microflora. I. Effects of diet, age, and periodic sampling on numbers of fecal microorganisms in man. *Gastroenterology*. 1967;53(6):845-55.
21. Mitsuoka T. Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora*. 1982;1:3-24.
22. Zoetendal EG, Akkermans ADL, Akkermans-van WM, de Visser JAGM, de Vos WM. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microb Ecol Health Dis*. 2001;13(3):129-34.

23. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(44):15718-
24. 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.
25. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(31):11070-5.
26. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022-3.
27. Cani PD, Joly E, Horsmans Y, Delzenne NM. Oligofructose promotes satiety in healthy human: a pilot study. *Eur J Clin Nutr*. 2006;60(5):567-72.
28. Cani PD, Neyrinck AM, Maton N, Delzenne NM. Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like Peptide-1. *Obes Res*. 2005;13(6):1000-7.
29. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005;115(5):1111-9.
30. Caricilli AM, Nascimento PH, Pauli JR, Tsukumo DM, Velloso LA, Carvalheira JB, et al. Inhibition of toll-like receptor 2 expression improves insulin sensitivity and signaling in muscle and white adipose tissue of mice fed a high-fat diet. *J Endocrinol*. 2008;199(3):399-406.
31. Carvalho-Filho MA, Ueno M, Hirabara SM, Seabra AB, Carvalheira JB, de Oliveira MG, et al. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes*. 2005;54(4):959-67.
32. Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, et al. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology*. 2005;146(3):1576-87.
33. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(8):1986-98.
34. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(7):1761-72.
35. Pappo I, Becovier H, Berry EM, Freund HR. Polymyxin B reduces cecal flora, TNF production and hepatic steatosis during total parenteral nutrition in the rat. *J Surg Res*. 1991;51(2):106-12.
36. Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher M, Da Silva NF, Khanolkar M, et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292(3):E740-7.
37. 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 J*. 2008;22(7):2416-26.
38. 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.
39. Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(3):979-84.