GABRIELA VIRGINIA MOREIRA

**LIRAGLUTIDA PROMOVE MUDANÇA DA MICROBIOTA INTESTINAL COM
REDUÇÃO DA MASSA ADIPOSITIVA E DA ESTEATOSE HEPÁTICA NÃO-
ALCÓOLICA EM DOIS MODELOS ANIMAIS DE OBESIDADE.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana e Biofísica no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Prof^o Dr^o Carla Roberta de Oliveira Carvalho

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2017

RESUMO

Moreira GV. Liraglutida promove mudança da microbiota intestinal com redução da massa adiposa e da esteatose hepática não-alcóolica em dois modelos animais de obesidade. [Tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo; Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

O presente estudo analisou os efeitos do análogo do GLP-1, liraglutida, na composição da flora intestinal e perda de peso de dois modelos de obesidade: um induzido por dieta hiperlipídica (HFD) e outro de obesidade genética (camundongos *ob/ob*). Para tanto, os dois modelos de obesidade foram tratados com liraglutida durante duas semanas. Os perfis metabólicos foram feitos por meio de testes glicêmicos e insulínicos, análise histológica do fígado, região cecal e dos coxins gordurosos, ingestão alimentar, peso corporal e análise metagenômica da região 16S rRNA de bactérias do conteúdo cecal. O tratamento induziu perda de peso significativa nos dois modelos estudados, com melhora dos níveis glicêmicos e redução de células inflamatórias na região cecal e do fígado, assim como promoveu o aumento de células calciformes epiteliais. Nos camundongos *ob/ob*, o tratamento com a liraglutida foi capaz de reduzir em 78% o acúmulo de gordura hepática promovendo a redução da doença gordurosa hepática não alcoólica (DGHNA) associada a redução do infiltrado inflamatório nos espaços porta hepáticos, portanto reduzindo a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA). As análises da microbiota intestinal mostraram que liraglutida mudou a estrutura geral taxonômica entre os grupos experimentais, bem como a abundância relativa de elementos bacterianos já sabidamente envolvidos com peso e controle glicêmico como redução de *Proteobacterias* e aumento de *Akkermansia muciniphila* no grupo HFD. Apresentamos a primeira evidência da ação da liraglutida induzindo atenuação da DGHNA de EHNA a simples esteatose hepática e perda de peso associados às mudanças da microbiota intestinal. Além do mais, esse estudo gerou uma nova lista de potenciais alvos bacterianos que podem interferir positivamente com o metabolismo energético na direção do controle clínico dessas doenças metabólicas.

Palavras-chave: Liraglutida. Análogo GLP-1. Microbiota intestinal. Obesidade. EHNA.

ABSTRACT

Moreira GV. Liraglutide changes gut microbiota and reduces hepatic steatosis and fat mass in two models of obesity mice. [Ph. D. thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

The present study was performed to analyze the effects of liraglutide on the composition of the gut microbiota and weight-loss in two obesity model: obesity induced by high fat diet (HFD) and genetic obese mice (*ob/ob*). Both models of obesity mice were treated with liraglutide for two weeks. Metabolic profiles were measured by glycemic and insulin test, histological liver, cecal region and fat pad morphologies were analyzed, food intake, body weight and metagenomic analysis of the region 16s rRNA of bacteria cecal contents. The treatment induced significant weight-loss in both obesity model with improvement of glycemic parameters and reduction of inflammatory cells in the cecum and the liver, as well as promoted the increase of epithelial goblet cells in animals with induced obesity. In *ob/ob* mice the liraglutide treatment was able to reduce by 78% the accumulation of liver fat thereby reducing the inflammatory non-alcoholic hepatic steatosis frame (NASH). The gut microbiota analyzes showed that liraglutide changed the overall structure as well the relative abundance of weight-relevant phylotypes as reduction of *Proteobacteria* and increases of *Akkermansia muciniphila* in treated HFD group. We present the first evidence of the action of liraglutide leading to the improvement of NASH and weight loss associated with changes in the intestinal microbiota. Moreover, by the profile of the intestinal microbiota, we present a list of potential bacterial targets that may affect the metabolism inducing a more similar metabolic profile to that considered normal or clinically controlled.

Keywords: Liraglutide. GLP-1 analogue. Gut microbiome. Obesity and NASH.

1 INTRODUÇÃO

O plano de ações estratégicas para o combate de doenças crônicas do Ministério da Saúde destaca diabetes, cardiopatias e acidente vascular encefálico como as principais doenças que levarão a perda econômica brasileira de US\$ 4.18 bilhões entre os anos de 2006 a 2015 ¹.

O último relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS) revela que mais de 16 milhões de brasileiros adultos (8,1%) portadores de diabetes, sendo a responsável pela morte de 72 mil pessoas por ano. O relatório também revela que 422 milhões de adultos em todo o mundo viviam com diabetes em 2014, quatro vezes mais do que em 1980 ².

Uma das principais causas atreladas à fatores de riscos metabólicos são o excesso de peso e a obesidade, que segundo o mesmo órgão, no Brasil, acomete 54% e 20% da população respectivamente ³.

Atualmente, um dos tratamentos disponíveis para o tratamento de pacientes com diabetes tipo 2 está sendo estudado como uma alternativa para o tratamento da obesidade devido seus efeitos colaterais.

A liraglutida é uma fármaco análogo ao GLP-1(*glucagon like peptide-1*), com 97% de homologia com o GLP-1 humano, incluindo uma mutação de lisina para arginina na posição 34 e uma cadeia lateral palmitoil na lisina 26 ⁴.

O GLP-1 é uma incretina secretada pelas células L da mucosa intestinal. Atua sobre as células das ilhotas pancreáticas induzindo a liberação de insulina pelas células β e a redução de glucagon pelas células α , em resposta à ingestão de alimentos ⁵. A ativação do receptor de GLP-1 (GLP-1R) induz a expressão de proteínas e genes que aumentam a proliferação e diminuem a apoptose das células β por diferentes vias de sinalização que culminam com a ativação das proteínas ERK1/2 ^{6,7}.

Estudos demonstraram que o GLP-1 é capaz de reprogramar as células β pancreáticas defeituosas tornando-as mais sensíveis à glicose ⁸; sendo que sua administração subcutânea em paciente com DM do tipo 2 promove a redução da glicemia e da HbA1c tanto no jejum quanto pós-prandial, além de promover a redução do peso corpóreo a longo prazo. ^{8,9}.

A resistência à insulina ¹⁰ e a obesidade ¹¹ são alguns dos fatores que resultam em defeitos na liberação do GLP-1. Essas alterações metabólicas promovem o menor estímulo do pâncreas para a biossíntese e sensibilidade à insulina, assim como o

aumento da secreção de glucagon, do esvaziamento gástrico e por consequência da ingestão alimentar ¹⁰⁻¹⁴. Diante disso, o GLP-1 facilita a rápida depuração e armazenamento de glicose no sangue ¹⁵.

Outros efeitos do GLP-1, como regulação da alimentação, motilidade gástrica, glicorregulação e função cardiovascular, são mediados pelo X par de nervos cranianos, o nervo vago e seu homólogo contralateral, que modulam atividades nos tecidos hepático, adiposo, muscular e pâncreas ^{11,16}.

Embora o GLP-1 endógeno tenha uma diversidade de efeitos fisiológicos, é rapidamente inativado, tendo uma meia-vida de menos de 2 minutos, por ação da enzima dipeptidil-peptidase-4 (DPP-IV) ¹⁷. A liraglutida, atualmente utilizada para tratamento do DM do tipo 2, possui resistência a degradação enzimática da DPP-IV, o que aumenta a meia-vida desse mimético hormonal na circulação por até 8 horas ¹⁸.

Recentes estudos sugerem um papel importante do GLP-1 e de sua atuação em células do epitélio intestinal, correlacionando seus efeitos a mudanças na flora intestinal ^{19,20}. Relacionam a fermentação produzida por bactérias intestinais com a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e a secreção/regulação de hormônios peptídicos ²¹ e principalmente de GLP-1 pelas células L intestinais ²²⁻²⁴.

Apesar das diversas evidências sobre os análogos do GLP-1, até agora não estão claros quais os fatores que contribuem para seus efeitos adipogênicos e se seus efeitos protetores possuem alguma relação com alterações da microbiota.

1.1 Microbiota intestinal

A flora intestinal é composta por aproximadamente 1.000 a 1.150 espécies diferentes de bactérias ²⁵ capazes de viver de modo comensal com seu hospedeiro, comunicando-se entre si por meio de transformações químicas fisiologicamente importantes ²⁶.

O papel da microbiota intestinal vem sendo reconhecido como um dos maiores fatores ambientais responsáveis por modificações metabólicas no organismo de seu hospedeiro ²⁷.

Em 2006, em um dos primeiros estudos relacionando microbiota intestinal com regulação metabólica, Turnbaugh et al. demonstraram que a transfecção da flora intestinal de camundongos obesos para camundongos *germ-free*, resultava em aumento da massa corpórea total quando comparados aos colonizados com

microbiota de animais magros. Os dados foram obtidos por meio da caracterização da microbiota intestinal de camundongos obesos (*ob/ob*) e seus controles magros (*ob/+* e *+/+*). Naquele estudo constataram que os animais obesos possuem maior proporção de bactérias intestinais do filo *Firmicutes* enquanto que os magros possuem maior proporção de bactérias do filo *Bacteroidetes* ²⁸. Resultados semelhantes foram observados com a manipulação da microbiota intestinal via antibiótico com ação inibitória sobre a síntese da parede celular bacteriana, a vancomicina, em pacientes obesos por 7 dias. Foi demonstrada redução da diversidade bacteriana e, em particular redução da abundância de *Firmicutes*, filo bacteriano envolvido com a produção de AGCC e ácidos biliares ²⁹.

Estudos do epitélio intestinal de camundongos *germ-free* mostram que os mesmos são mais suscetíveis às infecções, possuem a vascularização e a atividade de enzimas digestivas reduzidas e aumento nos níveis séricos de citocinas. No entanto, a reconstituição com uma microflora intestinal é suficiente para restaurar o sistema imunológico ³⁰.

Durante a digestão da gordura no trato gastrointestinal pode haver desencadeamento de respostas inflamatórias devido a ligação de componentes lipídicos da microbiota, como os lipopolissacarídeos, LPS, aos receptores do tipo *Toll Like Receptors* (TLR) presentes em células do sistema imunológico. Esses receptores estão envolvidos no reconhecimento de patógenos³¹. A função fisiológica desses TLR é sinalizarem para manutenção da barreira intestinal contra possível infiltração de patógenos, ou seja impedir infecção ³².

Novos estudos levantam a hipótese de que lipídios específicos das dietas atuais são reconhecidos pelo nosso sistema imunológico inato, mais especificamente pelo TLR4, como intrusos, semelhante a agentes patogênicos bacterianos. Estes TLR4 em macrófagos e tecido adiposo são induzidos a produzir citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez levam a resistência à insulina principalmente nos tecido muscular esquelético ³³.

Cani et al., (2008) também demonstraram que o tratamento com antibióticos reduz os níveis plasmáticos de LPS, a permeabilidade intestinal, os depósitos gordurosos viscerais e a infiltração por macrófagos em animais alimentados com dieta hiperlipídica.

Sabe-se que o tecido adiposo ³⁵ e o intestino ³⁶ possuem um papel central na secreção de inúmeros mediadores químicos que modulam o apetite, a ação da insulina e mesmo respostas inflamatórias.

Caricilli et al., (2011) analisaram a microbiota intestinal como um modulador da resistência à insulina em camundongos nocaute para o TLR2. Observou-se que esses animais possuíam um fenótipo semelhante ao da síndrome metabólica e com uma composição bacteriana similar à encontrada em indivíduos obesos, ou seja, com aumento da proporção de bactérias do filo *Firmicutes*. Essa modulação da flora intestinal estaria associada com aumentos de LPS plasmático, resistência à insulina e diabetes, acúmulo de triglicérides no fígado e da gordura corpórea.

A atividade metabólica bacteriana extrai substratos dos alimentos ingeridos que serão absorvidos fornecendo energia e nutrientes para o crescimento e proliferação bacteriana e do hospedeiro em questão ^{38,39}. Essa atividade metabólica se mostra importante quando comparamos camundongos *germ-free*, que requerem maior ingestão de calorias para manter um peso corporal normal ^{26,30}. Diante disto podemos pressupor que bactérias intestinais atuem como moduladores da deposição de gordura no hospedeiro.

Os mecanismos envolvidos na obesidade de animais *ob/ob* são diferentes dos envolvidos na obesidade por dieta. Camundongos *ob/ob* possuem mutação no cromossomo 6 que leva a ausência de leptina ou à presença de leptina não funcional, tornando-os ao fenótipo de resistência à insulina, hiperfagia e obesidade ⁴⁰. Os receptores de leptina desempenham papéis fundamentais no controle do apetite e na regulação do consumo de energia da mucosa gástrica de roedores e humanos. No tecido adiposo a secreção endócrina de leptina ocorre de forma lenta, e atua como um sinalizador ao sistema nervoso central, sobre o aporte energético do organismo e controle em longo prazo da ingestão de alimentos, gasto de energia e metabolismo da glicose nos tecidos periféricos. Por outro lado, a leptina também pode ser produzida e secretada por outros órgãos como a mucosa gástrica do estômago. Nesse órgão a secreção exócrina ocorre de forma rápida. A leptina chega ao duodeno ativando os receptores que se encontram na mucosa intestinal. Estes receptores estão envolvidos no controle da absorção de nutrientes pelos enterócitos, na secreção de muco pelas células caliciformes, na motilidade intestinal e na produção de peptídeos do tipo glucagon 1 e 2 (GLP-1 e GLP-2) que inibem o esvaziamento gástrico ³⁶.

Frente as recentes publicações na área de doenças de metabólicas, focar na compreensão do papel do trato gastrointestinal na regulação do equilíbrio energético do corpo e da função metabólica mostra-se cada vez mais importante para entender a miríade de respostas à resistência insulínica e obesidade.

Embora esteja bem estabelecido que a liraglutida melhora os parâmetros da homeostase de glicose, o papel potencial da liraglutida na obesidade, nos distúrbios hepáticos associados, na inflamação metabólica e na microbiota intestinal são desconhecidos.

Levando em consideração o exposto, nossa hipótese é que o efeito colateral da liraglutida sobre a obesidade de pacientes diabéticos tipo 2 poderia ser decorrente da modulação da flora intestinal. Para tanto, foram utilizados dois modelos animais de obesidade, um induzido por uma dieta hiperlipídica e o outro devido a alterações genéticas, *ob/ob*, com a finalidade de identificar possíveis Filos bacterianos comuns sob efeito da liraglutida.

1.2 Hipótese

O uso de análogos do GLP-1 atua sobre obesidade induzida via dietas obesogênicas e obesidade genética modulando a flora intestinal.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo confirmou a interação molecular e metabólica microbiota-hospedeiro. Além disso, demonstrou que o análogo do GLP-1, liraglutida, atua modulando as populações bacterianas em camundongos obesos e magros. Ademais, essa mudança está associada a melhora dos parâmetros glicêmicos, inflamatórios, atenuação da DGHNA - modificando quadro de esteato-hepatite (EHNA) a simples esteatose - e perda de peso em dois diferentes modelos de obesidade: um induzido por dieta rica de lipídios – e hiperleptinêmico - e outro modelo de obesidade genética - hipoleptinêmico.

O resultado da análise metagenômica da microbiota intestinal nos forneceu uma nova lista de potenciais alvos bacterianos que podem afetar o metabolismo em situações de obesidade e de EHNA. Abrindo campo extenso de investigação científica para avaliar os mecanismos de celulares de sinalização envolvidos.

E, por fim, esse estudo possui relevância clínica uma vez que demonstra efeito do uso da liraglutida a mais do que sua indicação. Esse fármaco pode minimizar ou reverter a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA), provavelmente pela modulação da diversidade da microbiota intestinal.

REFERÊNCIAS *

1. Malta DC, Morais Neto OL De, Silva Junior JB Da. Apresentação do plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis no Brasil, 2011 a 2022. *Epidemiol e Serviços Saúde* 2011; 20: 425–438.
2. WHO. Infobase global comparable estimates, risk factors: prevalence of diabetes <http://www.portal.pmnch.org/diabetes/global-report/en/> (2016).
3. WHO. *Infobase global comparable estimates, risk factors: prevalence of overweight and obesity map* <http://www.portal.pmnch.org/diabetes/global-report/en/> (2015).
4. Knudsen LB, Nielsen PF, Huusfeldt PO, et al. Potent derivatives of glucagon-like peptide-1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration. *J Med Chem* 2000; 43: 1664–1669.
5. Rask E, Olsson T, Söderberg S, et al. Impaired incretin response after a mixed meal is associated with insulin resistance in nondiabetic men. *Diabetes Care* 2001; 24: 1640–1645.
6. Forti ACE. Estratégias terapêuticas baseadas nas vias do GLP-1. *Johns Hopkins Adv Stud Med* 2006; 6: 618–626.
7. Quoyer J, Longuet C, Broca C, et al. GLP-1 Mediates Antiapoptotic Effect by Phosphorylating Bad through a -Arrestin 1-mediated ERK1/2 Activation in Pancreatic -Cells. *J Biol Chem* 2010; 285: 1989–2002.
8. Zander M, Madsbad S, Madsen JL, et al. Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and β -cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet* 2002; 359: 824–830.
9. Fujishima Y, Maeda N, Inoue K, et al. Efficacy of liraglutide, a glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue, on body weight, eating behavior, and glycemic control, in Japanese obese type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2012; 11: 107.
10. Holst JJ. On the physiology of GIP and GLP-1. *Horm Metab Res* 2004; 36: 747–754.
11. Drucker DJ. Glucagon-Like Peptide-1 and the Islet-Cell: Augmentation of Cell Proliferation and Inhibition of Apoptosis. *Endocrinology* 2003; 144: 5145–5148.
12. Huang Y, Wilkinson G, Willars G. Role of the signal peptide in the synthesis and processing of the glucagon-like peptide-1 receptor. *Br J Pharmacol* 2010; 159: 237–251.
13. Donato J, Frazão R, Elias CF. The PI3K signaling pathway mediates the biological effects of leptin. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2010; 54: 591–602.
14. Li Y, Tweedie D, Mattson MP, et al. Enhancing the GLP-1 receptor signaling pathway leads to proliferation and neuroprotection in human neuroblastoma cells. *J Neurochem* 2010; 113: 1621–1631.
15. Hayes MR, Kanoski SE, Alhadeff AL, et al. Comparative effects of the long-acting GLP-1 receptor ligands, liraglutide and exendin-4, on food intake and body weight suppression in rats. Epub

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

ahead of print 2013. DOI: doi:10.1038/oby.2011.50.

16. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007; 132: 2131–2157.
17. Neumiller JJ. Differential chemistry (structure), mechanism of action, and pharmacology of GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors. In: *J Am Pharm Assoc (2003)*. Department of Pharmacotherapy, College of Pharmacy, Washington State University, Spokane, WA 99217, USA. jneumiller@wsu.edu, pp. S16-29.
18. Drucker DJ, Dritselis A, Kirkpatrick P. Liraglutide. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 267–268.
19. Cani PD, Everard A, Duparc T. Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism. *Curr Opin Pharmacol* 2013; 13: 935–940.
20. Hwang I, Park YJ, Kim Y-R, et al. Alteration of gut microbiota by vancomycin and bacitracin improves insulin resistance via glucagon-like peptide 1 in diet-induced obesity. *FASEB J* 2015; 1–15.
21. Everard A, Cani PD. Gut microbiota and GLP-1. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2014, pp. 189–196.
22. Tsuda T. Possible abilities of dietary factors to prevent and treat diabetes via the stimulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Mol Nutr Food Res* 2015; n/a-n/a.
23. Dalgaard M, Thomsen C, Rasmussen BM, et al. Ethanol with a mixed meal decreases the incretin levels early postprandially and increases postprandial lipemia in type 2 diabetic patients. *Metabolism* 2004; 53: 77–83.
24. Iwasaki M, Hoshian F, Tsuji T, et al. Predicting efficacy of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in patients with type 2 diabetes: Association of glycated hemoglobin reduction with serum eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid levels. *J Diabetes Investig* 2012; 3: 464–467.
25. Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. 2013; 464: 59–65.
26. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005; 307: 1915–1920.
27. Tilg H, Cani PD, Mayer EA. Gut microbiome and liver diseases. *Gut* 2016; 65: 2035–2044.
28. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444: 1027–1031.
29. Reijnders D, Goossens GH, Hermes GDA, et al. Effects of Gut Microbiota Manipulation by Antibiotics on Host Metabolism in Obese Humans: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial. *Cell Metab* 2016; 24: 63–74.
30. Shanahan F. The host-microbe interface within the gut. *Bailliere's Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 915–931.
31. Velloso L a., Folli F, Saad MJ. TLR4 at the crossroads of nutrients, gut microbiota and metabolic inflammation. *Endocr Rev* 2015; er.2014-1100.
32. Wells JM, Rossi O, Meijerink M, et al. Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108 Suppl: 4607–4614.
33. Shi H, Kokoeva M V, Inouye K, et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid – induced insulin

- resistance. *J Clin Invest* 2006; 116: 3015–3025.
34. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. Epub ahead of print 2008. DOI: 10.2337/db07-1403.
 35. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006; 444: 840–846.
 36. Cammisotto PG, Levy É, Bukowiecki LJ, et al. Cross-talk between adipose and gastric leptins for the control of food intake and energy metabolism. *Prog Histochem Cytochem* 2010; 45: 142–200.
 37. Caricilli AM, Picardi PK, de Abreu LL, et al. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. In: *PLoS Biol.* Department of Internal Medicine, State University of Campinas, Campinas, Brazil., p. e1001212.
 38. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, et al. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 11070–11075.
 39. Asselin C, Gendron FP. Shuttling of information between the mucosal and luminal environment drives intestinal homeostasis. *FEBS Letters*, 2014, pp. 4148–4157.
 40. Marques-Lopes I, Marti A, Moreno-Aliaga MJ, et al. Aspectos genéticos da obesidade. *Revista de Nutricao* 2004; 17: 327–338.